



## 明細書

NF- $\kappa$ B 阻害剤を含む医薬組成物

- 6 開題文献とのクロスリファレンス  
本願は、2002年6月26日に出願した特願2002-185866号、及び2003年2月14日に出願した特願2003-37167号に基づく優先権を主張する。それらの文献をこの明細書中に援用する。
- 10 技術分野  
本発明は、医薬組成物、腫瘍細胞増殖阻害剤、接着分子発現抑制剤、アポトーシス誘導剤、動脈硬化または癌の予防・治療剤、及び悪液質治療剤、並びに治療方法に関する。
- 16 背景技術  
近年、各種腫瘍において NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が相次いで報告されている。例えば、膀胱癌 (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)、乳癌 (Cancer Res. 9: 3810-3818, 2001)、メラノーマ (Cancer Res. 61: 4901-4949, 2001) などの腫瘍で NF- $\kappa$ B がしばしば活性化されている。このような NF- $\kappa$ B の活性化はアボトーシス誘導機能を不活性化し、腫瘍の進展を促進している可能性があると考えられている。これは、I $\kappa$ B を高発現させることで NF- $\kappa$ B を阻害し、NF- $\kappa$ B の活性の高い新生細胞特異的に細胞死を誘導できることからも示唆される (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)。

## 16

## 背景技術

近年、各種腫瘍において NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が相次いで報告されている。例えば、膀胱癌 (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)、乳癌 (Cancer Res. 9: 3810-3818, 2001)、メラノーマ (Cancer Res. 61: 4901-4949, 2001) などの腫瘍で NF- $\kappa$ B がしばしば活性化されている。このような NF- $\kappa$ B の活性化はアボトーシス誘導機能を不活性化し、腫瘍の進展を促進している可能性があると考えられている。これは、I $\kappa$ B を高発現させることで NF- $\kappa$ B を阻害し、NF- $\kappa$ B の活性の高い新生細胞特異的に細胞死を誘導できることからも示唆される (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)。

また、悪液質 (cachexia; 悪液質とも表記される。) は、悪性腫瘍、結核、糖尿病、血液疾患、内分泌・代謝疾患などの慢性病において、食欲不振、進行する体重減少、貧血、皮膚乾燥、浮腫などを主症状とする全身不良を呈する疾患である。特に悪性腫瘍

2

- の末期患者などに、よくみられる症状であり、体重の減少・貧血などを中心とした全身機能の低下を示す。癌患者が悪液質を発症すると、合併症のリスクが高くなり、化学療法に対する反応が悪くなる。さらに、全身の衰弱のため、癌に対する化学療法や放射線治療の副作用も大きくなり、悪液質のため死に至ることもある。  
6 これまで、悪液質が発症する詳細なメカニズムは、完全には解明されていないが、近年になって、インターロイキン6 (IL-6) や腫瘍壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) など、幾つかのサイトカインの関与を含め、ようやく、そのメカニズムに觸れる手がかりが得られるようになってきた (最新医学 1999年 54巻10号 2502-2507頁)。例えば、癌細胞における様々な症状の発現機序としては、悪液質によって発現が誇導され過剰発現したサイトカインが、中枢神経系に作用し、摂食減少、発熱、低血压、無気力状態などの症状を引き起こし、また糖質、タンパク質、脂質の異化の亢進状態を招くとされる。

- 16 このような悪液質における症状を抑制するのにステロイド投与が有効である。悪液質患者にステロイドを投与すると、ステロイドの免疫反応抑制作用やそれにによる抗炎症作用、さらには悪液質誘導サイトカインの產生抑制作用により、癌悪液質の代謝異常が是正され、体重減少、食欲不振、無気力、味覚異常、貧血などの悪液質症状が軽減、改善される。しかし、ステロイドの長期服用は、その重篤な副作用が大きな問題となる。ステロイドは、本来自己の持つホルモンであるため、根取したステロイドは過剰なホルモンと同様の作用効果を示し、例えば、腎臓における塩の再吸収に觸ることにより、副作用として浮腫や高血圧が現われることがある。
- 一方、オメガ3不飽和脂肪酸が、IL-6などの炎症性サイトカインの产生を抑制したり、急性期反応蛋白の合成に影響することを利用して、EPA (eicosapentaenoic acid) の投与が悪液質の

<sup>3</sup>

改善に一定の効果を上げている。しかし、このような免疫抑制剤は、作用が間接的であるため、頭著で確実な効果は期待しにくい。  
したがって、ステロイドのような広範な作用を有する薬剤とは異なり、悪疾質に特異的で、効果の頭著な薬剤の開発が求められるようになつた。このような要請の下、例えば、サリドマイドには TNF- $\alpha$  の阻害効果があるため、悪疾質の症状の改善が期待され、癌疾質の治療剤として用いられるようになつた。しかし、TNF- $\alpha$  には、血管新生という生体内での別の作用があり、従つて、サリドマイドを投与すると、血管新生も阻害されるという副作用が生じる。このように、比較的特異性の高い薬剤であつても、副作用は必ず生じるのであるから、さまざまなかくさばく下での使用を考慮すると、異なる作用機序を有する様々な薬剤の開発が望まれている。

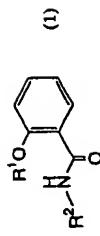
一方、動脈硬化にはコレステロールを減少させて間接的に治療効果のあるメバロチンなどが使われているが効果が不十分である。癌細胞転移阻害剤として臨床使用されているものはまだない。金属プロテアーゼ阻害剤などが開発中であるが全く約束される状況ではない。一般的な抗癌剤は副作用が強く、使用が著しく限定されているのは周知のとおりである。

そこで、本発明は、NF- $\kappa$ B の活性化を伴う症状を改善することができる医薬組成物を提供することを目的としてなされた。

<sup>4</sup>

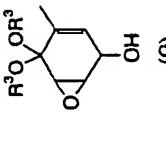
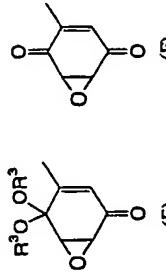
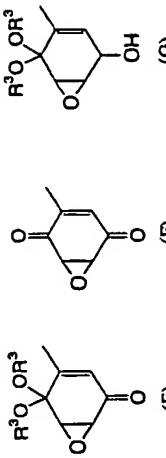
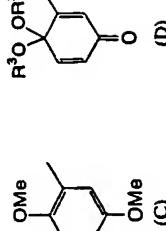
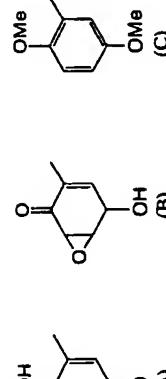
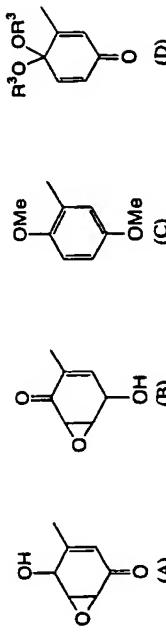
IL-8、TNF- $\alpha$  など)および細胞接着分子(例えば、ICAM-1、VCAM-1など)をコードする遺伝子の発現を調節する(Ghoshi, S.ら, Annu. Rev. Immunol., 16: 225-260 (1998))。このように、TNF- $\alpha$  の機能発現のための細胞内ターゲット分子の一つは NF- $\kappa$ B であると考えられる。

近年、NF- $\kappa$ B の活性化阻害作用を有する物質として、下記の一般式(1)で表される化合物が開発された(国際公開第 WO 01/12588 号パンフレット; Matsumoto ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 865 (2000))。



10

(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(C)のいずれかで表される基である。)



15

(式中、R<sup>3</sup>は C 1～4 のアルキル基である。)  
動脈硬化にも癌細胞転移にも血管内皮細胞の接着因子発現が

NF- $\kappa$ B は核内で機能する転写因子であるが、その内因性抑制因子である I $\kappa$ B の存在下では、それらは複合体を形成し、不活性型として細胞質に存在する。細胞が TNF- $\alpha$  などによる刺激を受けると、I $\kappa$ B の分解が誘導されて NF- $\kappa$ B が活性化し、活性化した NF- $\kappa$ B は、核内に移行して DNA の NF- $\kappa$ B 結合サイトに結合し、免疫反応や炎症反応に関与するサイトカイン(例えば、IL-1、IL-2、

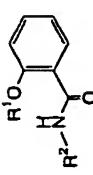
5

必要であることから、本発明者は、接着因子を発現させない薬剤を用いることで問題点を解決した。同様に、悪疫質発症のメカニズムに IL-6 や TNF- $\alpha$  が関与しているとすると、その細胞内ターゲット分子である NF- $\kappa$ B の機能阻害は、悪疫質による症状の予防／改善に有効である可能性があると考えた。

そこで、悪疫質の症状を誘発したモデルマウスに上記化合物を投与し、症状を観察したところ、悪疫質の症状の予防／改善に有効であることがわかり、本発明が完成した。本明細書では、症状とは、病気に関連したことによって生じる幅広い現象を指し、必ずしも患者が訴える外見上の異常のみを指すものではない。

すなわち、本発明に係る医薬組成物は、臓器細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善するための下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される量を有効成分として含有することを特徴とする。

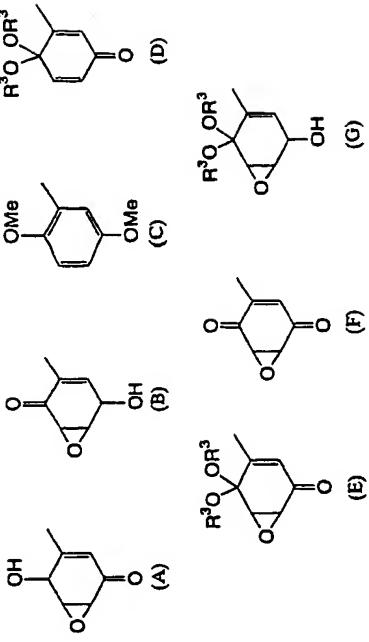
10



式中、R<sup>1</sup> は水素原子または C<sub>2</sub>～4 のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基などである。また、血管内皮細胞と基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup> は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

15



式中、R<sup>3</sup> は C<sub>1</sub>～4 のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基が好ましい。

異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

6 また、前記腫瘍細胞のアボトーシスによって、少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴としてもよいし、前記腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴としてもよい。

また、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴としてもよい。

前記症状は、例えば、腫瘍転移である。また、血管内皮細胞との接着を阻害することにより、腫瘍転移を改善することを特徴としてもよい。

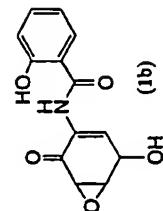
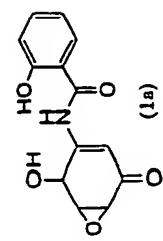
10 前記腫瘍細胞の増殖を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴としてもよい。

また、前記症状が、例えば、ホジキン病、癌悪疾質、白血病からなるグループから選ばれる症状である。前記腫瘍細胞は、例え

7

ば乳癌細胞などである。

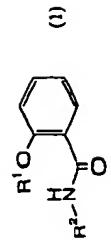
また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてよい。



前記癌細胞の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状が予防されるか、または改善することを特徴としてもよい。ただし、癌細胞に伴う諸症状は、これらに限らず、皮膚乾燥や浮腫などであっても、本発明の技術的範囲に属する。

また、本発明に係る医薬組成物は、前記癌細胞が形成する腫瘍内の血管新生を阻害することにより、前記癌細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴としてもよい。

また、本発明に係る医薬組成物は、NF- $\kappa$ B を活性化させる治療による NF- $\kappa$ B の前記活性化を阻害することにより、前記治療の効果を増大させることができると下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。



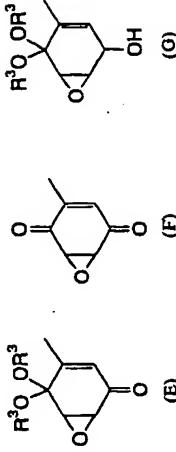
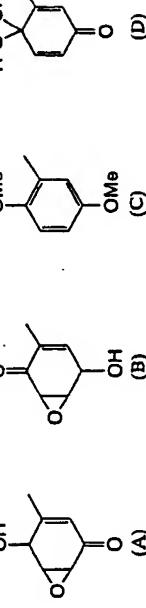
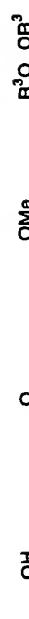
20

式中、R<sup>1</sup> は水素原子または C 2 ~ 4 のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル

8

基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup> は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



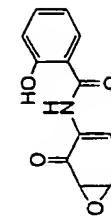
式中、R<sup>3</sup> は C 1 ~ 4 のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基として R<sup>3</sup> はメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

前記 NF- $\kappa$ B を活性化させる治療は、抗腫瘍剤を用いた治療であってもよいし、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であってよい。なお、前記医薬組成物と前記抗腫瘍剤とを有効成分として含有することとしてもよい。前記抗腫瘍剤としては、例えば、カンプトテシン、またはダウノルビシンである。

また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



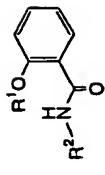
(1a)



(1b)

9

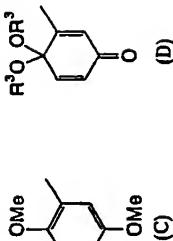
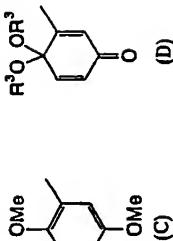
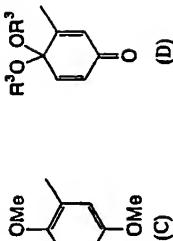
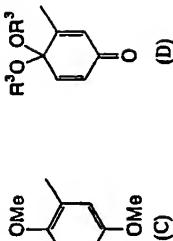
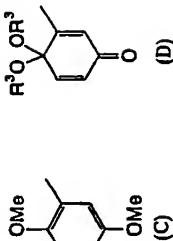
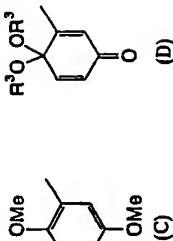
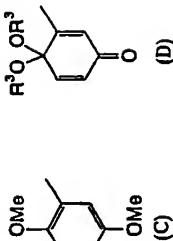
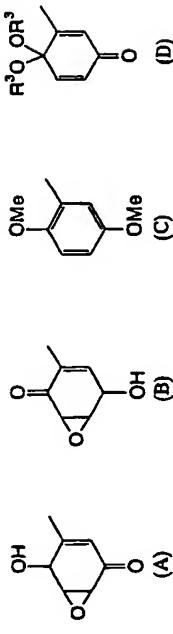
本発明に係る腫瘍細胞の増殖を阻害するための腫瘍細胞増殖阻害剤は、下記の一似式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。



6

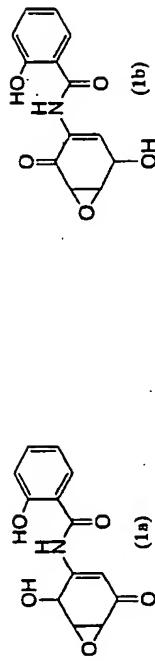
式中、R'は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノニル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



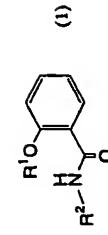
式中、R<sup>3</sup>は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノニル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



(1b)

10



本発明に係る血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制するための接着分子発現抑制剤は、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。

6 とを特徴とする。

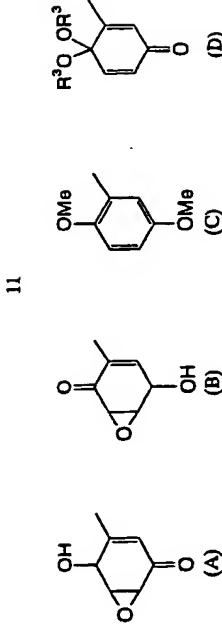
式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノニル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

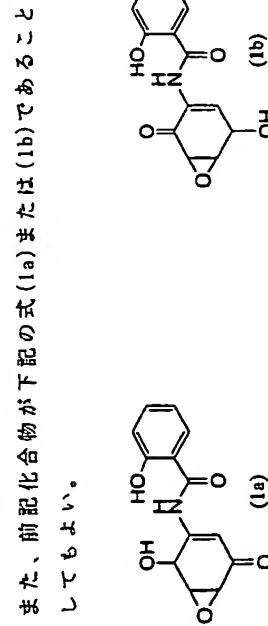


式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノニル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

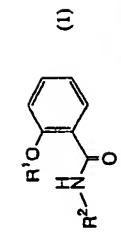
また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてよい。



式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。  
また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてよい。

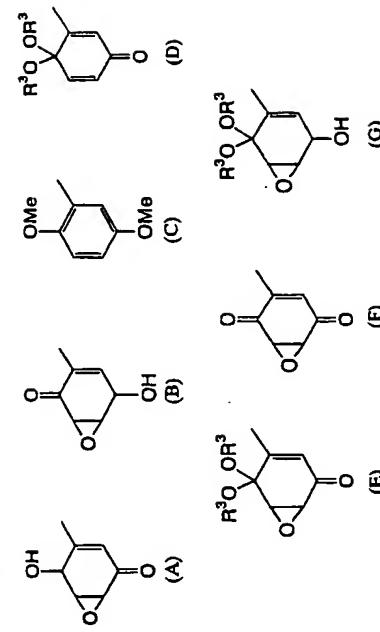


本発明に係る腫瘍細胞のアボトーシスを誘導するためのアボトーシス誘導剤は、下記の一級式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される量を有効成分として含有することを特徴とする。



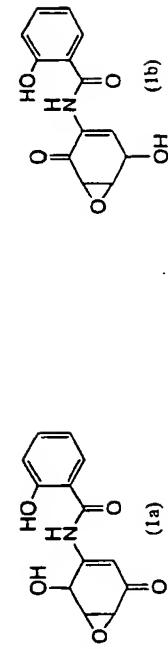
式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC2～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

6 R<sup>2</sup>は、下記の式(1a)から(1c)のいずれかで表される基である。



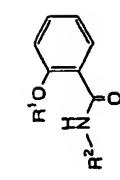
式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

10 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



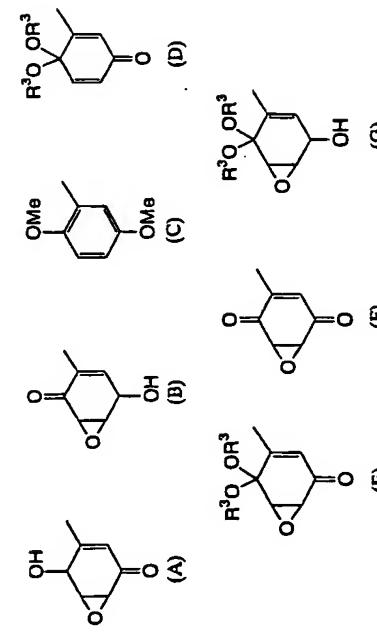
13

本発明の動脈硬化の予防・治療剤は、NF- $\kappa$ B 阻害作用を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする。前記 NF- $\kappa$ B 阻害作用を有する化合物は下記の一般式(1)で表される化合物またはその環理学的に許容される塩であってもよい。



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4 のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



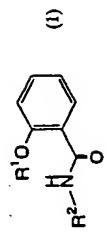
式中、R<sup>3</sup>はC 1～4 のアルキル基であり、アルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

また、前記予防・治療剤は、癌の転移抑制のために用いることはてもよい。

本発明の悪疾質治療剤は、下記の一般式(1)で表される化合物またはその環理学的に許容される塩を有効成分として含有する

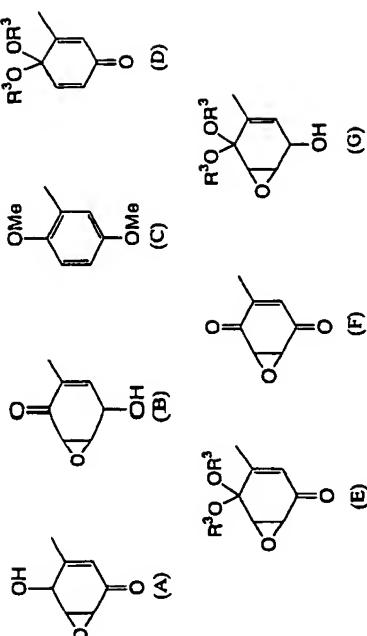
14

作用を有する化合物は下記の一般式(1)で表される化合物またはその環理学的に許容される塩であってもよい。



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4 のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



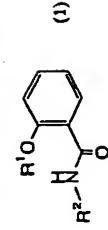
式中、R<sup>3</sup>はC 1～4 のアルキル基であり、アルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

また、前記予防・治療剤は、癌の転移抑制のために用いることはてもよい。

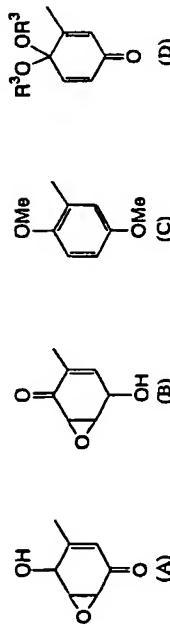
本発明の悪疾質治療剤は、下記の一般式(1)で表される化合物またはその環理学的に許容される塩を有効成分として含有する

15

15 ことを特徴とする。



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC2～4のアルカルノイル基であり、6 アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基であり、アルキル基として10 は、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



16

PCT/JP2003/008134

WO 2004/002465

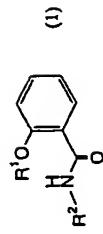
ことを特徴とする。



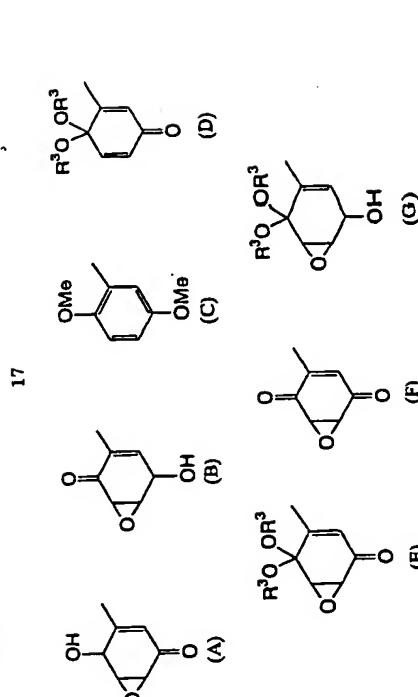
また、これらの化合物が、腫瘍患者（例えば、担癌患者）における癌悪質の治療剤であることを特徴としてもよいが、悪液質を発症している患者であれば、その原因は癌でなくともよい。

また、腫瘍患者（例えば、担癌患者）における癌悪質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状を予防されるか、または改善することを特徴としてもよい。ただし、悪液質に伴う諸症状は、これらに限らず、皮膚乾燥や浮腫などであっても、本発明の技術的範囲に属する。

さらに、本発明の悪液質治療剤は、NF-κB阻害作用を有する化合物を有効成分として含有してもよい。  
本発明に係る治療方法は、腫瘍細胞に起因する少なくとも1つ以上の症状を改善するための下記の一般式(1)で表される化合物または16 はその薬理学的に許容される量を用いることを特徴とする。



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC2～4のアルカルノイル基であり、20 アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

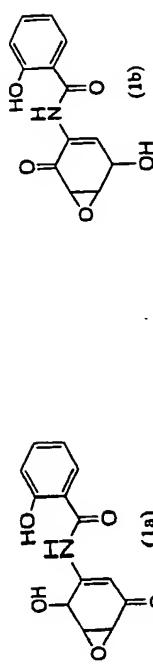


式中、R<sup>3</sup>はC 1～4のアルキル基であり、アルキル基としてメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、アセチル基が好ましい。なお、属性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

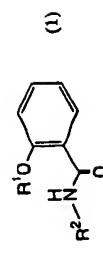
6 治療方法には、予防方法や進行抑制方法なども含まれる。  
前記腫瘍細胞のアボトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよいし、前記腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。また、NF-κBの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。

10 前記症状は、例えば、腫瘍転移、前記腫瘍細胞の増殖から生じる症状、ホジキン病、癌性疲労からなるグループから選ばれる症状である。

15 また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。

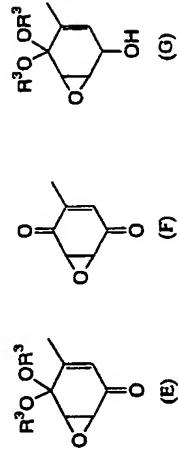
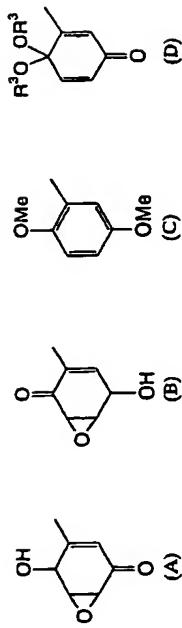


また、本発明に係る治療方法は、血管内皮細胞と白血球との接着を阻害することにより、動脈硬化を改善するための下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を用いることを特徴とする。



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、式中、R<sup>2</sup>はアルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。  
10 R<sup>3</sup>は、下記の式(1a)から(1b)のいずれかで表される基である。

19



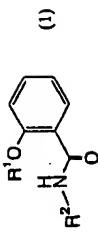
式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。なお、治療方法には、動脈硬化の予防方法や動脈硬化の進行抑制方法なども含まれる。

また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。

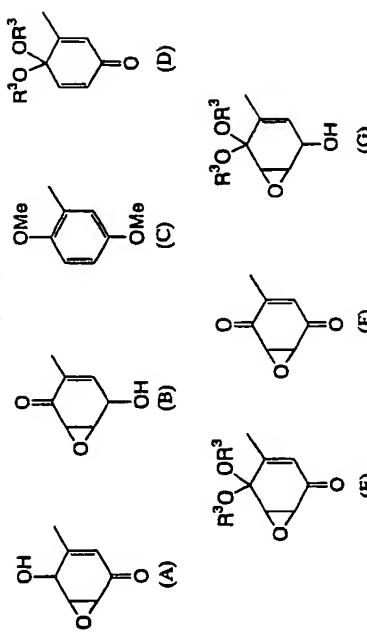


さらに、本発明に係る治療方法は、NF-κBを活性化させる治療を行うステップと、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物を投与するステップとを含むことを特徴とする。

20



式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC2～4のアルカルノイル基であり、アルカルノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。  
R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

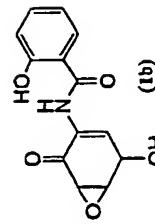
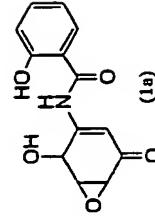


式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。なお、治療方法には、予防方法や進行抑制方法なども含まれる。  
前記NF-κBを活性化させる治療は、抗腫瘍剤の投与であってもよいし、腫瘍細胞に対する放射線照射であってもよい。

また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。

16

21



## 図面の簡単な説明

図 1 は、NF- $\kappa$ B 阻害作用を有する化合物が、動脈硬化および癌の転移を抑制する作用機構を説明する模式図である。

図 2 は、TNF- $\alpha$  で刺激した時の DHMEQ による阻害効果を示す図である。

図 3 は、TNF- $\alpha$  で刺激した時の ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチンの発現を DHMEQ が抑制した効果を示す図である。

図 4 は、DHMEQ が、HUVECs と白血球（上）または HL-60 細胞（下）の接着を抑制した効果を示す図である。

図 5 は、ATL 細胞の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、ゲルシフトアッセイの解析結果を示す図である。

図 6 は、ATL 細胞の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、レポーター遺伝子アッセイの解析結果を示す図である。

図 7 は、ATL 細胞の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、共焦点顕微鏡の解析結果を示す図である。

図 8 は、DHMEQ の ATL 細胞に対する増殖阻害作用の経時依存性解析結果を示す図である。

図 9 は、DHMEQ の ATL 細胞に対する増殖阻害作用の経時依存性解析結果を示す図である。

図 10 は、DHMEQ の ATL 患者末梢血細胞に対する増殖阻

害作用の解析結果を示す図である。

図 1 1 は、DHMEQ の正常末梢血単核球に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 1 2 は、DHMEQ の ATL 細胞に対するアボトーシス诱导作用の解析結果を示す図である。

図 1 3 は、DHMEQ のホジキンリンパ腫細胞に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 1 4 は、DHMEQ の多発性骨髄腫細胞に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 1 5 は、TNF- $\alpha$  によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化を DHMEQ が阻害する効果を示す図である。

図 1 6 は、MCF-7 に対する DHMEQ の増殖抑制効果を示す図である。

図 1 7 は、SCID マウス移植ヒト乳癌細胞株 MCF-7 に対する DHMEQ の増殖抑制効果を示す図である。

図 1 8 は、ルイス肺腫瘍と、HT-29 に対する COX-2 阻害剤セレコキシブの増殖抑制効果を示す図である。

図 1 9 は、本発明の一実施例において、p6kb-Luc を JCA-1 細胞にトランスクエクトし、様々な濃度の DHMEQ を投与した時のルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

図 2 0 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗癌マウスに DHMEQ を投与した時のマウスの体重の時間的变化を示すグラフである。

図 2 1 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗癌マウスに DHMEQ を投与した時の腫瘍径より算出した腫瘍重量の時間的变化を示すグラフである。

図 2 2 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗癌マウスに DHMEQ を投与開始後 26 日目の腫瘍重量を示すグラフである。

23

図 2 3 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗筋マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目の精巢周囲の脂肪の重量を示すグラフである。

図 2 4 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗筋マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目の肝臓筋の重量を示すグラフである。

図 2 5 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗筋マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目のヘマトクリット値を示すグラフである。

図 2 6 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した粗筋マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目に解剖して測定した各臓器の重量を示す図である。

図 2 7 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髓腫 (MM) 細胞株の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化阻害作用についての結果を示す図である。

図 2 8 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髓腫 (MM) 細胞株の増殖阻害作用についての結果を示す図である。

図 2 9 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髓腫 (MM) 患者細胞の増殖阻害作用についての結果を示す図である。

図 3 0 は、本発明の一実施例において、D H M E Q によるホジキンリンパ腫 (HL) 細胞株の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化阻害作用についての結果を示す図である。

図 3 1 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による抗腫瘍作用強効果についての結果を示す図である。

図 3 2 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による抗腫瘍作用強効果が抗腫瘍剤による NF- $\kappa$ B 活性化の阻害によるものであることを示す図である。

24

図 3 3 は、本発明の一実施例において、ATL 細胞株を腹腔内に接種した SCID マウスを用い、in vivo での D H M E Q の効果を調べた結果を示す図である。

図 3 4 は、本発明の一実施例において、放射線照射した腫瘍細胞における D H M E Q のアボトーシス増強効果について調べた結果を示す図である。

図 3 5 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の in vivo と腫瘍に対する腫瘍細胞の増殖抑制効果について調べた結果を示す図である。

図 3 6 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の放射線併用におけるヒト肺癌細胞株に対する in vitro 増殖抑制効果について調べた結果を示す図である。

図 3 7 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の放射線併用におけるヒト肺癌細胞株に対する in vitro 増殖抑制効果について調べた結果を示す図である。

図 3 8 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の好ましい形態を実施するための最良の形態により、当業者には明らかであらう。以下に記載される発明の実施の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい形態を示すものであり、例示または説明のために示されていてあるのであつて、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書に記した記載に基づき、様々な改変並びに修饰ができることは、当業者に明らかである。

本発明を実施するための最良の形態により、当業者には明らかであらう。以下に記載される発明の実施の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい形態を示すものであり、例示または説明のために示されていてあるのであつて、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示され

ている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書に記した記載に基づき、様々な改変並びに修饰ができることは、当業者に明らかである。

本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することが可能である。腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞にアボトーシスを生じさせてもよい。この方法の対象症状としては、例えば、ホジキン病、白血病などを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないでもよく、例えば、腫瘍転移、癌細胞などを持つ

である。

本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することが可能である。腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞にアボトーシスを生じさせてもよい。この方法の対象症状としては、例えば、ホジキン病、白血病などを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないでもよく、例えば、腫瘍転移、癌細胞などを持つ

25

ことができるが、これらに限定されたものではない。ここで、腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないとは、本発明に係る医薬組成物を患部に投与しても、その効果はその患部における腫瘍細胞のアボトーシスに依存しないことを意味するが、アボトーシスが依存しない効果とは別に、腫瘍細胞のアボトーシスが生じていてもかまわない。なお、腫瘍とは、癌の癌と同じ意味を有し、例えば、リンパ系悪性腫瘍、乳癌、担癌、肺癌などを指す。

NF- $\kappa$ Bの活性化は、アボトーシスの制御、細胞増殖、細胞分化等をはじめとする腫瘍形成の様々な面に関与することが報告されている (Albert S. Baldwin, J. Clin. Invest. 107 : 241-246 (2001))。さらに、化学療法又は放射線療法による癌細胞でのNF- $\kappa$ Bの活性化は、癌治療の効果を減少させることが報告されている (Albert S. Baldwin, 前出)。従って、本発明者らは、上述のように癌においても、抗生物質エボキシクイノマイシンC (epoxyquinomicin C) の構造をもとに、デザインし、合成した上述の一様式(1)で殺されるDHMEQが抗癌作用を有すると考へていた。

本発明者らは、DHMEQを用いて、成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)細胞のNF- $\kappa$ Bの活性化に与える影響を調べたところ、DHMEQは、ATL細胞のNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害することを明らかにした。また、DHMEQを用いて、ATL細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは、正常細胞の増殖は阻害しないが、ATL細胞の増殖は阻害することを明らかにした。さらに、ATL細胞のアボトーシスの誘導に与える影響を調べたところ、DHMEQはATL細胞のアボトーシスは誘導するが、正常細胞のアボトーシスは誘導しないことを明らかにした。なお、NF- $\kappa$ B阻害作用を有する化合物としては、サリチル酸アミド誘導体(WO01/12588 A1)、バネがキシドン(panepoxoydone; Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996)、シクロエボキシドは

26

ドン(cycloepoxydon; J. Antibiot. 51, 455-463, 1998), SN-50 (J. Biol. Chem. 270, 14255-14258)を挙げることができる。その他のNF- $\kappa$ B阻害作用を有する化合物の製造方法は、以下の文献に記載されている。バネがキシドンはBiochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996に記載され、シクロエボキシドはJ. Antibiot. 51, 455-463, 1998に、SN50はJ. Biol. Chem. 270, 14255-14258, 1995に記載されている。

また、本発明者らは、DHMEQを用いて、ホジキンリンパ腫細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは、NF- $\kappa$ Bが活性化しているホジキンリンパ腫細胞の増殖は阻害するが、NF- $\kappa$ Bが活性化していない骨髄球系の白血病細胞の増殖は阻害しないことを明らかにした。また、DHMEQを用いて、多発性骨髄腫細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは多発性骨髄腫細胞の増殖も阻害することを明らかにした。

従来の化学療法は細胞に普遍的な増殖機構を広く標的としているため、腫瘍細胞のみならず正常細胞に対する影響も大きく、必ずしも有効な治療手段となつていなかった。しかし、上述の一様式(1)で殺されるNF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQは、NF- $\kappa$ Bが活性化している白血病細胞のアボトーシスを誘導し、同じ濃度でヒト正常白血球のアボトーシスを全く誘導しないという実験結果(図8及び1-1)から、腫瘍細胞に対する特異性が高いことが明らかになっている。従つて、DHMEQは、従来の化学療法より副作用が少なく、悪性腫瘍をはじめとする腫瘍に対して医薬組成物としてより有用である。

また、DHMEQは、腫瘍細胞のアボトーシス誘導剤としても有用である。例えば、本発明に係る医薬組成物は、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖阻害作用及びリンパ系悪性腫瘍細胞のアボトーシス誘導作用によって、リンパ系悪性腫瘍を予防又は治療することができる。予防又は治療の対象となるリンパ系悪性腫瘍の種類

27

は特に限定されたものではないが、悪性リンパ腫、白血病又は骨髓の予防又は治療に好適に使用できる。悪性リンパ腫には、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫等が含まれ、骨髓腫には、多発性骨髓腫等の形質細胞性腫瘍等が含まれ、白血病には、急性リンパ性白血病、成人T細胞白血病リンパ腫、慢性リンパ性白血病等が含まれる。

本発明に係る腫瘍細胞増殖阻害剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖阻害作用によって、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖を抑制することができる、これにより、リンパ系悪性腫瘍細胞を予防又は治療することができる。増殖阻害の対象となるリンパ系悪性腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではないが、悪性リンパ腫細胞、白血病細胞又は骨髓腫細胞の増殖阻害に好適に使用できる。悪性リンパ腫、白血病又は骨髓腫には、上記に例示した各種リンパ系悪性腫瘍細胞が含まれる。

本発明に係るアボトーシス誘導剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞のアボトーシスを誘導することによって、リンパ系悪性腫瘍細胞のアボトーシスを誘導することができ、これにより、リンパ系悪性腫瘍を予防又は治療することができます。アボトーシス誘導の対象となるリンパ系悪性腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではないが、悪性リンパ腫細胞又は骨髓腫細胞のアボトーシス誘導に好適に使用できる。悪性リンパ腫、白血病又は骨髓腫には、上記に例示した各種リンパ系悪性腫瘍細胞が含まれる。

本発明に係る医薬組成物、腫瘍細胞増殖阻害剤、及びアボトーシス誘導剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞に対して特異的に作用し、正常細胞に対する悪影響はほとんど示さないので、リンパ系悪性腫瘍の優れた予防・治療効果が期待できる。

一般式(1)で表される化合物(特に、DHMEQ)およびその薬理学的に許容される量は癌細胞にも作用するが、癌組織の間質(癌組織の中でも正常細胞による構成される部分)細胞に作用す

28

る。特に、癌組織中の血管内皮細胞において、DHMEQはアボトーシスは起こさないが、接着因子等の発現を抑えて(図5)、接着の進展に抑制効果を与える。

炎症性刺激や物理的刺激などが血管内皮細胞に加わると、接着分子の発現が増強され、白血球が血管内皮細胞表面に接着し、血管外へ移動する。これは、血管内皮細胞内の転写因子であるNF- $\kappa$ Bが活性化されることにより、ICAM-1、VCAM-1、E-CAM-1などの接着分子の発現を活性化するからである。また、転移能の高い大腸癌でもE-セレクチンのリガンドであるシアリルLIL-Xが高発現することが報告されており、血管内皮細胞内の転写因子であるNF- $\kappa$ Bが活性化されると、大腸癌細胞が血管内皮細胞表面上に接着しやすくなり、これにより血管外へ浸出しやすくなり、転移促進に働くことが考えられている。そこで、血管内皮細胞表面上の上記接着分子の発現を抑制することは動脈硬化や腫瘍転移の制御につながると考えられ、NF- $\kappa$ B阻害剤は動脈硬化や癌細胞の転移抑制に有用であると考えられる。

そこで、本発明者は、DHMEQを用いて、DHMEQがヒト肺静脈内皮細胞(HUVECs)の接着分子発現に与える影響を調べた。TNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化をグルシフトアッセイにより評価したところ、I $\kappa$ B- $\alpha$ の分解を抑制することなく、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制した。また、ウエスタンプロットティング法でTNF- $\alpha$ によって誘導されるICAM-1、VCAM-1、E-セレクチンの発現に与えるDHMEQの影響を調べたところ、これら接着分子の発現を抑制し、実際には白血球とHUVECsの接着、白血病細胞との接着も阻害することを見い出した。白血球の血管壁への接着は脂質の蓄積などを介して動脈硬化を誘導する一方、癌細胞の接着は血管からの侵出、転移を引き起こす。そこでこれら接着を阻害することは、前者において抗動脈硬化剤に、後者において癌転移抑制剤ににつながる。従つて、NF- $\kappa$ B阻害作用を有する上記

29

化合物は動脈硬化または癌細胞の転移を抑制するのに有用である（図1）。また、後述する実施例により、DHMEQは血管内皮細胞の接着因子の発現抑制剤として有用である。

アボトーシス非依存性効果の他の例として、細胞の増殖抑制がある。本発明者は、DHMEQを用いて、ヒト乳癌細胞に対してin vitroおよびin vivoで増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQがヒト乳癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。一般式(1)で表される化合物およびその架橋学的に許容される型は、乳癌細胞の増殖抑制効果を有する。従って、これらの化10合物は、乳癌細胞の予防・治療剤として有用である。

従来、乳癌の治療は、大別すると、化学療法（抗癌剤を使用する治療法）とホルモン療法の2つの方法が知られている。これらの方針は、ともに癌を縮小させ、また再発を防ぐ効果があることが知られているが、問題点もあつた。すなわち、抗癌剤の場合は母性（副作用）があるという最大の問題があり、薬剤耐性も大きな問題であった。ホルモン療法では、まずホルモン感受性のある癌にしか効かないという問題点がある。ホルモン感受性のある癌は全体の約60%であり、残りの40%の患者は最初からホルモン療法を適用することができない。またホルモン療法も耐性の出現があり、大きな問題となつている。従って、DHMEQは乳癌に対しても非常に有用であるといえます。

また、本発明者は、慢性病、特に、悪性腫瘍の末期患者などによくみられる悪液質症のメカニズムにIL-6やTNF- $\alpha$ が関与しているため、その細胞内ターゲット分子であるNF- $\kappa$ Bの機能阻害は、悪液質による症状の予防／改善に有効であると考え、検査についてもDHMEQが有用であるか否かを調べた。すなわち、悪液質の症状を誘発したモデルマウスにDHMEQを投与し、20また、本発明者は、各抗腫瘍剤によるNF- $\kappa$ B活性化を調べた。いずれの抗腫瘍剤（カンプトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）、エトポシド（EPT）で処理しても処理前のものと比較して、一過的に3から20倍のNF- $\kappa$ B活性が腫瘍細胞に生じていることを見い出した。これにより、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果は抗腫瘍剤を用い、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果を検討したところ、いずれにおいてもDHMEQは抗腫瘍剤の効20果を增强することが見い出された。

また、本発明者は、各抗腫瘍剤（カンプトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）、エトポシド（EPT）で処理しても処理前のものと比較して、一過的に3から20倍のNF- $\kappa$ B活性が腫瘍細胞に生じていることを見い出した。これにより、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果は抗腫瘍剤によるNF- $\kappa$ B活性化の阻害によるものであることを明らかにした。

次に、DHMEQによる抗腫瘍剤によるNF- $\kappa$ B活性化の阻害について調べるために、各抗腫瘍剤（カンプトテシン（CPT）、ダ

30

質にも有用であることが明らかとなつた。

また、本発明に係る医薬組成物は、NF- $\kappa$ Bの活性化を阻害することができるため、NF- $\kappa$ Bの活性化により起こるシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の遺伝子発現を抑制することができると考へられる。また、シクロオキシゲナーゼ-2の遺伝子発現を抑制することができるにより、プロスタグランдинの合成も抑制することができる。これにより、プロスタグランдинにより促進される腫瘍血管の新生を阻害又は抑制することができると考へられる。従つて、本発明に係る医薬組成物は、腫瘍内における血管新生を阻害し、腫瘍への酸素や栄養分の供給を阻害することにより抗腫瘍作用を呈する癌治療薬としても有用であると期待される。

また、本発明者は、化学療法や放射線療法などのNF- $\kappa$ Bを活性化させる治療による腫瘍細胞でのNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害することにより、腫瘍治療の効果を増大させることができるのはないかと考え、まず、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果を調べた。すなわち、カンプトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）などの抗腫瘍剤を用い、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果を検討したところ、いずれにおいてもDHMEQは抗腫瘍剤の効20果を增强することが見い出された。

また、本発明者は、各抗腫瘍剤（カンプトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）、エトポシド（EPT）で処理しても処理前のものと比較して、一過的に3から20倍のNF- $\kappa$ B活性が腫瘍細胞に生じていることを見い出した。これにより、DHMEQによる抗腫瘍剤作用增强効果は抗腫瘍剤によるNF- $\kappa$ B活性化の阻害によるものであることを明らかにした。

次に、DHMEQによる抗腫瘍剤によるNF- $\kappa$ B活性化の阻害について調べるために、各抗腫瘍剤（カンプトテシン（CPT）、ダ

31

ウノマイシン(DNR)にDHMEQを併用して腫瘍細胞を処理した時のNF- $\kappa$ B活性化を調べたところ、いずれの抗腫瘍剤で処理してもNF- $\kappa$ B活性化はDHMEQ併用により強く抑制されることは見い出した。

一方、放射線治療は活性酵素を発生させて正常組織のDNAも傷つけて別の癌を発生させたり、残っている癌細胞を悪化させたりする可能性がある。また、放射線照射による酸化ストレスによって、NF- $\kappa$ Bの活性化が誘導されると、癌細胞はアボトーシスを起こしにくくなり、放射線治療に抵抗性を示すことが知られており。そこで、本発明者は、DHMEQと放射線照射とを併用した場合も相乗効果が得られるのではないかと考え、DHMEQの放射線併用における腫瘍細胞に対するin vitro増殖抑制効果について調べた。その結果、放射線照射との併用でDHMEQは相乗的な増殖抑制効果を示すことを見い出した。

このように、本発明に係る医薬組成物は、抗腫瘍剤を用いる治療や腫瘍細胞に対する放射線照射による治療などにより引き起こされるNF- $\kappa$ Bの活性化の阻害剤としても有用である。また、本発明に係る医薬組成物は、抗ウイルス剤との併用も有用である。本発明に係る医薬組成物は、NF- $\kappa$ Bを活性化させる抗腫瘍剤を用いる治療としては、NF- $\kappa$ Bを活性化させる抗腫瘍剤であれば特に限定されるものではないが、例えば、カンプトアシン、ダウノルビシンなどを挙げることができる。

本発明に係る医薬組成物は、腫瘍疾患、アレルギー疾患、免疫疾患、炎症性疾患などの疾患に対して用いられる治療と併用することにより、治療の効果を増大させることができる。本発明の医薬組成物は、NF- $\kappa$ Bを活性化させる治療と同時に用いてもよいが、NF- $\kappa$ Bを活性化させる治療の後にNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害するために用いることとしてもよい。また、NF- $\kappa$ Bの活性化を阻害するために、干渉上記疾患を伴うヒト及びヒト以外の哺乳類動物に投与することとしてもよい。

32

一方、現在の抗癌剤治療の一つの大きな問題点は癌細胞に薬剤排出を機構とする耐性がしばしば生じることである。正常細胞への作用は一般的には耐性が生じにくいためである。従って、まずこの点が本発明の乳癌の予防・治療剤の有利な点である。次に6は毒性が低いことが予測されており、化学療法に比較した場合の有利な点である。さらに、作用メカニズムからすると、ホルモン療法が対象としないホルモン非感受性の腫瘍も治療の対象になる。この点はホルモン療法と比べ大きな利点になる。以上より、毒性が少ないこと、ホルモン療法と対象が重ならないこと、血管内皮細胞等に耐性が生じにくいことは、臨床上大きな利点となる。

また、これらの点は、既存の薬剤との幅広い併用や癌予防への応用の可船性を示唆するものもある。

以上のこどから、本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞増殖阻害剤、接着分子発現抑制剤、アボトーシス誘導剤、動脈硬化また10は癌の予防・治療剤、リンパ系悪性腫瘍の予防・治療剤、乳癌の予防・治療剤、悪性腫瘍などに有用であるといえる。

従って、本発明に係る一般式(1)で表される化合物を有効成分として含有する医薬組成物は、腫瘍、悪変質、動脈硬化などの治療(予防や進行抑制剤などを含む)に有用である。

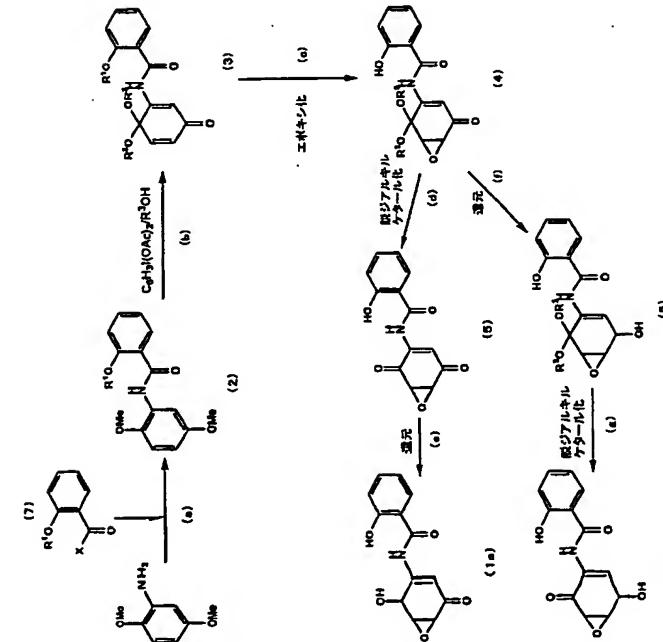
以下、本発明の化合物の製造方法、使用形態、使用例(実施例)20について、詳細に記述する。

==本発明の化合物の製造方法==

一般式(1)で表される化合物は、Wipfらの合成法(Synthesis, 12号, 1549~1561頁, 1995年)に準じて製造することができます。

以下に、一般式(1)で表される化合物の製造方法の一例を下記の反応工程式に基づいて説明する。

25



**工程 a :  $N - (2\text{-}R\text{-}C_6H_4\text{-}CH}_2\text{NHCO}_2\text{R}'\text{R}''$ ) - 2, 5 - ジメトキシアニリンの調製**

6 2, 5 - ジメトキシアニリンを溶媒（ピリジンなど）に溶解させ、 $-78 \sim 50^\circ\text{C}$ 、式(7)の  $O\text{-アルカルサリチロイルハライド}$  の酢酸エチル溶液を加えて、搅拌しながら反応させる。水を加えて反応を停止させた後、酢酸エチルを加え、塩酸、水、重曹水、水で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮及び真空乾燥することにより式(2)で示される  $N - (2\text{-}R\text{-}C_6H_4\text{-}CH}_2\text{NHCO}_2\text{R}'\text{R}''$  が得られる。この化合物は精製せず、次の工程に使用できる。

**工程 b :  $3 - (O\text{-}R\text{-}C_6H_4\text{-}CH}_2\text{NHCOR}'\text{R}''$ ) - 4, 5 - ジアルコキシ - 2, 5 - シクロヘキサジエノン化合物の調製**

上記で得られた式(2)の化合物をメタノールなどの溶媒に溶解させ、 $-20 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは冰冷下で、ジアセトキシヨードベンゼンを加え、室温で搅拌しながら反応させる。減圧濃縮後、酢酸エチルを加え、重曹水、食塩水で順次洗浄し、溶剤を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製することにより、式(3)で示される  $3 - (O\text{-}R\text{-}C_6H_4\text{-}CH}_2\text{NHCOR}'\text{R}''$  - 4, 5 - ジアルコキシ - 2, 5 - シクロヘキサジエノン化合物が得られる。

**工程 c :  $5, 6 - E\text{-}PO_2\text{R}'\text{R}'' - 4, 4 - \text{ジアルコキシ} - 3 - \text{サリチロイルアミド} - 2 - \text{シクロヘキサジエノン化合物の調製}$**

式(3)で示される  $3 - (O\text{-}R\text{-}C_6H_4\text{-}CH}_2\text{NHCOR}'\text{R}''$  - 4, 5 - シクロヘキサジエノンを溶剤（テトラヒドロフラン、メタノールなど）に溶解させ、 $-20 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは冰冷下で、過酸化水素水及び水酸化ナトリウムを加え、搅拌しながら反応させる。反応液に酢酸エチルを加え、塩酸溶液、チオ硫酸ナトリウム水溶液、食塩水で順次洗浄し、大気中で乾燥した後、真空乾燥する。残存する原料化合物を除去するため、残渣をアセトンに溶解させ、 $\text{P}-\text{トルエンスルホン酸}$ を加え、室温で搅拌して原料化合物を分解する。メタノールを減圧留去して得られた残渣に酢酸エチルを加え、水で洗浄する。酢酸エチル層を乾燥して得られた残留物をカラムクロマトグラフィーで精製して、式(4)で示される  $5, 6 - E\text{-}PO_2\text{R}'\text{R}'' - 4, 4 - \text{ジアルコキシ} - 3 - \text{サリチロイルアミド} - 2 - \text{シクロヘキサノン化合物が得られる}。$

**工程 d :  $5, 6 - E\text{-}PO_2\text{R}'\text{R}'' - 4 - \text{ジオンの調製}$**

式(4)の  $5, 6 - E\text{-}PO_2\text{R}'\text{R}'' - 4, 4 - \text{ジアルコキシ} - 3 - \text{サリチロヘキセン} - 1, 4 - \text{ジオンの調製}$

35

リチオルアルミド-2-シリクロヘキセノン化合物を溶剤（塩化メチレンなど）に溶解させ、氷冷下で無機酸または有機酸（三フッ酸カルシウムジエチルエーテル錯体など）を加え、搅拌しながら反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチルなど）を加え、水で洗浄し、酢酸エチル層を濃縮した後、得られた残渣をメタノールで洗浄して式(6)で示される5, 6-エボキシー-2-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセン-1, 4-ジオンを得られる。

工程o: 5, 6-エボキシー-4-ヒドロキシ-3-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセノン (1a, DHM2EQ) の調製

式(6)で示される5, 6-エボキシー-2-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセン-1, 4-ジオンを、溶媒（メタノール、エタノール、THFなど）に懸濁し、-78～50℃、好ましくは氷冷下で、還元剤（水素化ホウ素ナトリウムなど）を加えて反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチル、塩化メチレンなど）を加え、塩酸、水で順次洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮して、メタノールで懸濁、搅拌、洗浄して、式(1a)で示される5, 6-エボキシー-4-ヒドロキシ-3-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセノン (DHM2EQ) が得られる。

工程f: 3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エボキシ-6-ヒドロキシ-2-シリチオルアルミドシリクロヘキセンの調製

式(4)の5, 6-エボキシー-4, 4-ジアルコキシ-3-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセノン化合物をメタノールなどの溶剤と重曹水溶液に溶解し、-78～50℃、好ましくは氷冷下で、還元剤（水素化ホウ素ナトリウムなど）を加え、搅拌しながら反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチルなど）を加え、塩酸、水で順次洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮、真空乾燥し、カラムクロマトグラフィーなどで精製して、式(6)で示される3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エボキシ-6-ヒドロキシ-2-シリチオルアルミドシリクロヘキセノンを得る。

36

工程g: 5, 6-エボキシー-4-ヒドロキシ-2-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセノン (1b, DHM3EQ) の調製

式(6)で示される3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エボキシ-6-ヒドロキシ-2-シリチオルアルミドシリクロヘキセンを5倍量の溶剤（アセトンなど）に溶解させ、PTO（酢酸エチル）を溶剤（酢酸エチルなど）、室温で搅拌しながら反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチルなど）を加え、水で洗浄し、溶剤層を乾燥し、減圧濃縮して、精製して、式(1b)の5, 6-エボキシ-4-ヒドロキシ-2-シリチオルアルミド-2シリクロヘキセノン (DHM3EQ) を得ることができる。

一般式(1)で表される化合物は、弱酸性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基などの塩と、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩の形でも利用できる。これらの中には、公知の方法で製造することができる。

====本発明の化合物の使用形態====

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩は、単独で使用してもよいし、あるいは他の薬剤（例えば、他の抗癌剤、ホルモン療法剤）と組み合わせて使用してもよい。

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約1～100mg/kg（体重）、好ましくは4～12mg/kg（体重）の投与量で、1回または数回に分けて経口投与または静注してもよいが、その投与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、体重、治療期間、治療効果、投与方法などにより適宜変更しうる。

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩は、薬理上許容される担体と配合し、乳剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの製剤にして経口投与してもよいし、注射剤などの製剤にして皮下、筋肉内、腹腔内や静脈内へ注

37

射する、あるいは、坐薬（座剤）などの製剤にして直腸内投与する、あるいは、噴霧剤などの製剤にして口腔または気道粘膜へ噴霧する、あるいは、軟膏やテープ剤などの製剤にして患部（例えば、皮膚や粘膜など）に塗布又は貼付するような態様で非経口投与することもできる。

6 乳剤やシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロビレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、オリーブ油、大豆油等の油類、D-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として使用して製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンパン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑潤剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、セラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として使用して製造できる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液またはこれらの混合物を担体として使用して製造できる。担剤は、例えば、カカオ脂、水溶化脂肪またはカルボン酸等を担体として使用して製造できる。噴霧剤は、例えば、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体として、乳糖、グリセリン等を使用して製造でき、エアロソル、ドライバウダー等に製剤化できる。

20 製理上許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が1種又は2種以上用いられ、製剤化されていてもよい。具体的には、水、物理上許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ベクチン、チャコラーゲン、ポリビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキス

38

ンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、セラチン、ゼラチン、グリセリン、プロビレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血液アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等を挙げることができる。

5 製剤化に際して使用される添加物としては、例えば、固体製剤における賦形剤、滑潤剤、崩壊剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などを用いてもよい。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、充填剤、增量剤、付湿剤、表面活性剤、安定化剤、殺菌剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などの製剤添加物を用いることもできる。これらの添加物は製剤の投与単位形態等に応じて適宜選択される。なお、これらの添加物のうち、通常の製剤に使用される成分、例えば、安定化剤、緩衝剤、等張化剤、pH調整剤、界面活性剤等が好ましく選択される。

6 添加剤の具体例を以下に例示する。

7 安定化剤：ヒト血清アルブミン；グリシン、システィン、グルタミン酸等のL-アミノ酸；グルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターーチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類及びそれらの誘導体等の糖類；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース、澱粉等。

8 界面活性剤：ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタ

39

ンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等の界面活性剤。  
緩衝剤：ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\epsilon$ -アミノカブロ  
ン酸、グルタミン酸およびそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、  
カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩  
やアルカリ土類金属塩）。

等強化剤：塩化カリウム、塩類、グリセリン  
等。  
キレート剤：エデト酸ナトリウム、クエン酸等。

製剤中の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に評  
価される塩（有効成分）の含有率は、1～90重量%の間で変動  
させることができ。例えば、緩衝剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤  
などの形態をとる場合には、有効成分を5～80重量%含有させ  
るのが好ましい。シロップ剤などの液剤の場合には、有効成分を  
1～90重量%含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与す  
る注射剤の場合には、有効成分を1～10重量%含有させるのが  
好ましい。

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に評価される  
塩の製剤化は、賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトールな  
どの糖類、パレイショ、コムギ、トウモロコシなどのデンパン、  
炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなどの無  
機物、結晶セルロースなど）、結合剤（デンパンのり液、アラビ  
アゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、  
エチルセルロース、ポリビニルビロリドン、ポリビニルアルコー  
ル、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースなど）、滑沢  
剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、水溶性添加植物油、マク  
ロゴール、シリコーン油）、崩壊剤（デンパン、寒天、ゼラチン  
末、結晶セルロース、CMC・Na、CHC・Ca、炭酸カルシウム、炭酸  
水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど）、嗜味嗜臭剤（乳  
糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、芳香性精油類など）、溶剤

40

（注射用水、滅菌精製水、ゴマ油、ダイズ油、トウモロコシ油、  
オリーブ油、綿実油など）、安定剤（蜜素、二酸化炭素などの不  
活性ガス、EDTA、チオグリコール酸などのキレート剤、亜硫酸水  
素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、レーエスコルビン酸、ロンガ  
リットなどの還元物質など）、保存剤（バラオキシ安息香酸エス  
テル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、塩  
化ベンザルコニウムなど）、界面活性剤（水素添加ヒマシ油、ボ  
リソルベート80、20など）、緩衝剤（クエン酸、酢酸、リン  
酸のナトリウム塩、ホウ酸など）、希釈剤などを用いて、公知の  
方法で行われる。

以下、本発明にかかる実施例を詳細に説明する。以下の記載で  
は、特に説明がない場合、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T.  
Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd  
edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New  
York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D.  
Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Eds.), *Current  
Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd.など  
の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾し  
たり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定裝  
置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付の  
プロトコールを用いる。

なお、以下の実施例で用いた式(1a)で表される化合物（D H M  
E Q）は、W001/12588 A1 の実施例 1～5 に記載の方法により製  
造した。以下、式(1a)で表される化合物を「D H M 2 E Q」と呼  
び、式(1b)で表される化合物を「D H M 3 E Q」と呼ぶ場合があ  
る。

&lt;実施例 1&gt;

ゲルシフトアッセイ（Gel shift assay；Electrophoretic  
mobility shift assay (EMSA)）により NF- $\kappa$ B の活性化を調べた

41 ところ、D H M E Q は H U V E C s (慶應病院にて腫瘍より調製した)  
において TNF- $\alpha$  (Techne)、IL-1 $\beta$  (PEPRO TECH EC LTD)、LPS  
(Sigma) による NF- $\kappa B$  の活性化を  $3 \mu g/ml$  で完全に抑制した。  
42 図 2 には H U V E C s を TNF- $\alpha$  で刺激した時の D H M E Q による  
NF- $\kappa B$  活性化に対する阻害効果を示す。実験方法は以下のとおり  
である。

pH7.6、1 mM EDTA) を  $80\mu\text{l}$  加え  
column (Amersham) で精製し、 $^{32}\text{P}$  で  
を得た。

合成オリゴヌクレオチド：

5' -AGT TGA GGG GAC TTT CGC  
3' -TCA ACT CCC CTG AAA GG  
次に、5×binding buffer (375 mM  
7. 5 mM EDTA、7. 5 mM DTT、37. 5% ノ  
カライトヌクレオチド)、0. 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA(Si)  
10 整した poly dI-dC (Amersham) を  
え全量が  $17\mu\text{l}$  になるようウニ蒸留  
のサンプルにはさらに抗 p65 抗体  
した。これに  $^{32}\text{P}$  でラベルされた 1  
25°Cで 30 分間インキュベートした後  
15 流を流しておいた 4% ポリアクリ  
ゲル (6. 7 mM アクリルアミド (acry  
10 × TBE buffer (0. 9 M Tris-boric  
EDTA)、42 mL  $\text{H}_2\text{O}$ 、500  $\mu\text{l}$  APS (amin  
化学)、50  $\mu\text{l}$  TEMED(関東化学) の  
15 ルをアブライし、150Vで泳動した  
ゲルドライヤーを用いて乾燥させ  
20 <実施例 2 >  
25 ウエスタンプロットティング (W  
TNF- $\alpha$  で刺激した時の ICAM-  
(E-selectin) の発現に DHMEQ  
TNF- $\alpha$  単独のとき ICAM-1、VCAM-  
クを迎え、E-セレクチンの発現は  
が、図 3 に示すように DHMEQ  
はそれら接着分子のいずれの発現

を得た。

下オーラヨヌリ成才者

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (配列番号1)

卷之三

7.5mM EDTA, 7.5mM DTT, 37.5% β-巯基乙醇, 1.5% NP-40(ナフタレンジエチルアミノポリエチレンオキシド), 10mM Tris-HCl, pH 7.0

カライトスク)、0.5 μg/ml BSA(Sigma)を4 μl、1 μg/μlに調

疊じた poly di-*dC* (*Amersham*) を  $1\ \mu\text{l}$ 、 $3\ \mu\text{g}$  方の核酸物を加えた。スーパーシフト用

のサンプルにはさらに抗 p65 抗体 (Santa Cruz) を  $0.5 \mu\text{g}$  分添加

流を減しておいた4%ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide

10×TBE buffer (0.9M Tris-boric acid(硼酸) : pH8.3、20mM gel) (6.1mm) より下 (aciylamide :  $J_{V/2}$  :  $\mu$ ル / : 1.25ml)

EDTA)、42ml H<sub>2</sub>O、500 μl APS(ammonium peroxodisulfate；関東

化率)、 $50\mu\text{M}$  IEMED(製葉化子)のソエルにて20μL、シリカ

ゲルドライヤーを用いて乾燥させ、それをフィルムに感光させた

～実験的～  
ウエスタンブロッティング (Western blotting) 法により、

TNF- $\alpha$  で刺激した時の ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチン

TNF- $\alpha$  単独のとき ICAM-1、VCAM-1 の発現は刺激後 9 時間でピー

クをを迎え、E-セレクチンの発現は刺激後 6 時間でピークを迎える

はそれら接着分子のいすれの発現も顕著に抑制された。実験方法

は以下のとおりである。  
D H M E Q を 2 時間前処理した H U V E C s と無処理の H U V E C s をそ  
れぞれ 10ng/ml TNF- $\alpha$  で刺激し、細胞をサンプリングした。こ  
れに lysis buffer (20mM Tris-HCl : pH8.0、150mM NaCl、2mM EDTA、  
6 100mM NaF(関東化学)、400μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>(関東化学)、1% NP-40、  
1μg/ml ロイペプチド (leupeptin ; (財) 微生物化学研究所)、1mM  
PMSF) を加え、氷上で 5 分ごとに振拌しながら 30 分間可溶化し、  
その後 15000×g で 10 分間遠心にかけ上清を回収した。この上清  
10 のタンパク質濃度をクマーシーブリリアントブルー液 (Bio-Rad)  
で定量し、濃度を調整したあと 3×SDS loading buffer (150mM  
Tris-HCl : pH6.8、30% グリセロール、3% SDS(関東化学)、  
0.03mg/ml プロモフェノール・ブルー (bromophenol blue)、  
150μl/ml 2-メルカバトエタノール (2-mercaptoethanol ; 関東化  
学) )を、加えた lysis buffer の半分量加え、5 分間煮沸した。こ  
れをサンプルとし、12.5% ポリアクリルアミドゲル  
(polyacrylamido gel) を用いて電気泳動後、ゲ  
ル内のタンパク質を PVDF 膜 (Amersham) にトランスファーし、6%  
スカラムミルク (skim milk ; 雪印) を含む TBS buffer (20mM  
Tris-HCl : pH7.6、137mM NaCl) でプロッシングを行った。その  
後、ICAM-1 (Santa Cruz)、VCAM-1 (Santa Cruz)、E-セレクチン  
(Santa Cruz) それぞれの抗体を用いて PVDF 膜と抗体反応をさ  
せ、さらにそれぞれに適した 2 次抗体 (ICAM-1、VCAM-1、及び E-  
セレクチンの 2 次抗体 (Amersham 及び Santa Cruz)) と反応させた。  
そして、ECL 法により発色させ、フィルムに感光させた。

## &lt; 実施例 3 &gt;

図 4 に示すように白血球 (実験者の血液より調製)、HL-60 細胞  
(細胞ベンクより購入) 共に TNF- $\alpha$  刺激し、3、6、9 時間後の細  
胞接着数は時間依存的に増加したが、D H M E Q を 3μg/ml 処理

するとの接着は顕著に抑制された。この濃度の D H M E Q は  
H U V E C s に対して、毒性も増殖抑制も示さなかった。実験方法は以  
下のとおりである。

- 24 ワエルプレートに H U V E C s をまき、コンフルエンント  
6 (confluent) に培養した。培地の組成は、9.8g/1 培地 199 (ニ  
ッスイより供与)、1.8g/1 NaHCO<sub>3</sub> (Wako)、10ml/1 1M Hepes  
buffer (Sigma)、30mg/1 ECGS (Becton Dickinson)、6ml/1 ヘパリ  
ンナトリウム注射液 (武田薬品)、10% heat-inactivated  
PBS (JRH) である。その後、以下の実験を行った。D H M E Q を 2  
10 時間前処理した H U V E C s と無処理の H U V E C s をそれぞれ 10ng/ml  
TNF- $\alpha$  で刺激し、刺激後 0、3、6、9 時間の白血球およびヒト急  
性前骨髓球性白血病細胞 HL-60 細胞の H U V E C s に対する接着を評価  
した。今回、比重遠心分離法により分離した单核球を白血球とし  
て用いた。
- 15 TNF- $\alpha$  で刺激後、ウェルを HBSS+ (ニッスイより供与) で 2 回  
充填し、500μl の培地 (培地の組成 : 9.8g/1 培地 199 (ニッスイよ  
り供与)、1.8g/1 NaHCO<sub>3</sub> (Wako)、10ml/1 1M Hepes buffer (Sigma),  
30mg/1 ECGS (Becton Dickinson)、6ml/1 ヘパリンナトリウム注  
射液 (武田薬品)、10% heat-inactivated PBS (JRH) ) で培地交換  
を行い、白血球は 2.5×10<sup>6</sup> cells/ウェル、HL-60 細胞は 7×10<sup>4</sup>  
20 cells/ウェルになるようにウェルに入れた。5% CO<sub>2</sub>、37°C で 1  
時間インキュベートし、その後 HBSS+ で 3 回継やかに洗い、その  
状態を写真にとつて H U V E C s に接着している細胞数を数えた。  
以上のように毒性、増殖抑制を示さず NF- $\kappa$ B の活性化を抑制  
した H U V E C s と白血球および白血病細胞の接着を抑制したという点  
で、この D H M E Q は実験や臨床での長期使用が可能であり、有  
用であると考えられる。

< 実施例 4 >  
成人 T 細胞 白 血 病 リ ン バ 潤 (ATL) 細 胞 の 構 成 的

46

(constitutive)NF- $\kappa$ B活性に対するD HM 2 EQの阻害作用

(1) デルシフトアッセイ

細胞の核内に存在する転写因子がプロモーターの特定の塩基配列を持つ領域と結合するかどうかを以下のようにして検討した。

$2 \times 10^6$  個の ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) とコントロール細胞株 (K562, Jurkat+TNF) を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D HM 2 EQ で 12 時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製した。また、D HM 2 EQ で処理しない各細胞株からも同様に核抽出液を調製した。なお、細胞株 MT-1 及び TL-0m1 は、HTLV-1 でトランスクォームした細胞株であり、これらの細胞株では NF- $\kappa$ B が活性化している。細胞株 K562 (骨髄球系の白血病細胞株) は構成的 NF- $\kappa$ B を認めない細胞株であり (陰性コントロール)、Jurkat+TNF は、TNF 処理した Jurkat 細胞株である (陽性コントロール)。

NF- $\kappa$ B コンセンサスオリゴマー (Promega) を [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP とボリヌクレオチドキナーゼ (PNK) を用いて末端ラベルして  $^{32}\text{P}$ 標識 NF- $\kappa$ B プローブを作製した。

核抽出液のタンパク量  $2 \mu\text{g}$  相当と、 $10,000\text{cpm}$  相当の NF- $\kappa$ B プローブとを  $20 \mu\text{l}$  のボリュームで混合し、室温で 30 分間反応させた。反応後の溶液を 7.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルを乾燥後、X線フィルムに感光させた。

結果を図 5 に示す。なお、図中、左から 6 レーンにおいて、「-」は D HM 2 EQ 未処理の結果、「+」は D HM 2 EQ 処理の結果を示す。右端 2 レーンの陽性コントロールにおける「-」と「+」は、「comp」と右に表示されているように、非標識プローブによる競合阻害（「+」は競合分子存在下での実験）の結果を示し、シグナルが NF- $\kappa$ B 結合配列に特異的であることを示す。

図 5 に示すように、D HM 2 EQ 処理によって ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) における NF- $\kappa$ B のシグナルがほぼ消した。一方、K562

46

では、NF- $\kappa$ B の活性化が観察されていない。

(2) レポーター遺伝子アッセイ (Reporter gene assay ; Luciferase assay)

NF- $\kappa$ B の転写活性を検討するため、NF- $\kappa$ B 結合配列を 6 コピ 6 一くり返して持つ人工的なプロモーターでドライプされるルシ フエラーゼコンストラクト (6kB-Luc plasmid) をレポーターとして用い、このプラスミド DNA を ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) に一過性に導入した ( $2 \times 10^6$  個細胞／トランスクエクションのスケールで、DMRIE-C(INVITROGEN) を用い 10 てトランスクエクションした)。12 時間後より、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D HM 2 EQ で処理し、48 時間後に細胞を回収して、NF- $\kappa$ B の転写活性をルシフェラーゼの酵素活性として評価した。また、D HM 2 EQ で処理しない各細胞株においても同様の評価を行なった。なお、全ての実験は 3 回行い平均値と標準偏差を算出した。

16 結果を図 6 に示す。なお、図中、「-」は D HM 2 EQ 未処理の結果、「+」は D HM 2 EQ 処理の結果を示す。

図 6 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では、ルシフェラーゼ活性が D HM 2 EQ 処理によって約 50% に抑制され、D HM 2 EQ による ATL 細胞株の NF- $\kappa$ B 転写活性抑制効果が認めら 20 れた。一方、ネガティブコントロール細胞株 (K562) ではルシフェラーゼ活性が認められなかった。

(3) 共焦点顕微鏡による解析

D HM 2 EQ は NF- $\kappa$ B のサブユニット p65 の核移行を阻害すると言えられる。そこで、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D HM 2 EQ で 24 時間処理し、蛍光標識した抗 p65 抗体を用いて、p65 の分布を共焦点顕微鏡により検討した。また、D HM 2 EQ で処理しない各細胞株についても同様の検討を行なった。結果を図 7 に示す。なお、図中、「-」は D HM 2 EQ 未処理の結果、「+」は D HM 2 EQ 処理の結果を示す。

47

図 7 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では、核が黒く抜けしており、D H M 2 E Q 处理によって p65 の核移行が阻害されていることが示された。

上記 (1) ~ (3) の結果から、D H M 2 E Q が、ATL 細胞の構成的 NF- $\kappa$ B 活性化を阻害することが確認された。

&lt;実施例 5&gt;

## D H M 2 E Q の ATL 細胞に対する増殖阻害作用

(1) D H M 2 E Q の増殖阻害作用の濃度依存性解析

96 ヴェルのプレートに、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) の各細胞を  $1 \times 10^6$  個／ウェル播き、D H M 2 E Q を目的の最終濃度 (2, 5, 10  $\mu$  g/ml) になるよう添加した。溶媒である DMSO のみを等容量加えたもの (0  $\mu$  g/ml) をコントロールとして用いた。72 時間培養後、MTT アッセイ法により、細胞の生存率を判定した。相対 MTT 値 (Relative MTT value) は、D H M 2 E Q 未処理細胞の MTT 値に対する D H M 2 E Q 处理細胞の MTT 値／D H M 2 E Q の比、すなわち (D H M 2 E Q 处理細胞の MTT 値／D H M 2 E Q 未処理細胞の MTT 値)  $\times 100\%$  として求めた。

結果を図 8 に示す。なお、図中、□は K562、▲は TL-0m1、■は MT-1 の結果を示す。

20 図 8 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では D H M 2 E Q 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害されるのにに対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかった。

(2) D H M 2 E Q の増殖阻害作用の経時的解析

ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) に対して D H M 2 E Q を最終濃度が 10  $\mu$  g/ml になるよう添加して、12, 24, 48, 72 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみをコントロールとして用いた。相対 MTT 値 (Relative MTT value) は上記 (1) と同様にして求めた。

48

結果を図 9 に示す。なお、図中、□は K562、▲は TL-0m1、■は MT-1 の結果を示す。

図 9 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では D H M 2 E Q 处理時間に比例して細胞増殖が阻害されるのにに対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかった。

(3) D H M 2 E Q の ATL 患者末梢血細胞に対する増殖阻害作用

ATL 患者末梢血より単核球を分離し、ATL 細胞を分離した。患者 3 症例について、分離した ATL 細胞に對し D H M 2 E Q を最終濃度が 10  $\mu$  g/ml となるよう添加して、24 時間培養を行い、増殖作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみを等容量加えたものをコントロールとして用い、D H M 2 E Q 未処理細胞の MTT 値に対する D H M 2 E Q 处理細胞の MTT 値の比、すなわち (D H M 2 E Q 处理細胞の MTT 値／D H M 2 E Q 处理細胞の MTT 値) によって、増殖阻害作用を評価した。

結果を図 10 に示す。

図 10 に示すように、D H M 2 E Q は、いずれの ATL 患者から得られた ATL 細胞に對しても増殖阻害作用を示すことが確認された。ATL 細胞に対する MTT 値を図 10 に示す。

結果を図 11 に示す。

(4) D H M 2 E Q の正常末梢血单核球に対する増殖阻害作用

20 正常末梢血より単核球を分離し、D H M 2 E Q を最終濃度が 2, 5, 10  $\mu$  g/ml となるよう添加して、72 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみを等容量加えたものの (0  $\mu$  g/ml) をコントロールとして用いた。

細胞の生存率 (Cell Viability) は、コントロール (D H M 2 E Q 未処理) の MTT 値を 100% としてそれとの比で表した。結果を図 11 に示す。

図 11 に示すように、D H M 2 E Q は、正常末梢血单核球に対してほとんど増殖阻害作用を示さなかった。

上記 (1) ~ (4) の結果から、D H M 2 E Q は、ATL 細胞の

49

増殖は阻害するが、正常細胞の増殖は阻害しないことが確認された。

## &lt;実施例 6&gt;

D H M 2 E Q の ATL 細胞に対するアボトーシス誘導作用

ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) に対して D H M 2 E Q を最終濃度が  $10 \mu \text{g}/\text{ml}$  になるよう添加して 72 時間培養を行った後、ヘキスト染色して核の凝縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアボトーシスの検討を行った。また、溶媒である DMSO のみを等量添加したものについても同様の検討を行った。

結果を図 1.2 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理 (DMSO のみ) の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

図 1.2 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では D H M 2 E Q 処理によりアボトーシスが誘導され、核の断片化が観察されたのにに対し、D H M 2 E Q 未処理細胞及びコントロール細胞株 (K562) ではアボトーシスは観察されなかった。

この結果から、D H M 2 E Q は、ATL 細胞のアボトーシスは誘導するが、正常細胞のアボトーシスは誘導しないことが確認された。

## &lt;実施例 7&gt;

D H M 2 E Q のホジキンリンパ腫細胞に対する増殖阻害作用の経時的解析及び濃度依存性解析を、実施例 2 と同様にして行った。ホジキンリンパ腫細胞としては、ホジキンリンパ腫細胞株 KMII-2 及び L-540 を用いた。

結果を図 1.3 に示す。なお、図中、■は K562, ○は KMII-2, ●は L-540 の結果を示す。

図 1.3 示すように、ホジキンリンパ腫細胞株 (KMII-2, L-540) では D H M 2 E Q 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害されるのに

50

対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかつた。また、ホジキンリンパ腫細胞株 (KMII-2, L-540) では D H M 2 E Q 処理時間に比例して細胞増殖が阻害されるのに對し、コントロール細胞株 (K562) では時間が経つても細胞増殖がほとんど阻害されなかつた。

これらの結果から、D H M 2 E Q は、NF- $\kappa$ B が構成的に活性化しているホジキンリンパ腫細胞の増殖は阻害するが、NF- $\kappa$ B 活性化のないコントロール細胞の増殖は阻害しないことが確認された。

## 10 &lt;実施例 8&gt;

D H M 2 E Q の多発性骨髓腫細胞に対する増殖阻害作用の濃度依存性解析を、実施例 2 と同様にして行った。多発性骨髓腫細胞としては、多発性骨髓腫細胞株 196T1B を用いた。

結果を図 1.4 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

図 1.4 に示すように、多発性骨髓腫細胞株 (196T1B) では D H M 2 E Q 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害された。この結果から、D H M 2 E Q は、多発性骨髓腫細胞の増殖を阻害することが確認された。

## 20 &lt;実施例 9&gt;

MCF-7 細胞における NF- $\kappa$ B と DNA の結合を D H M 2 E Q が阻害する効果

## 1. 方法

MCF-7 細胞 (オックスフォード大学 Adrian L. Harris 教授より分与) を  $1 \times 10^6$  細胞/ $\text{ml}$  で  $4 \text{ml}$  ダラフ 60ml dish に 1 つの条件につき 2 枚ずつまいた。翌日、60mm dish 中の培地を  $2 \text{ml}$  に合わせて、1、3、 $10 \mu \text{g}/\text{ml}$  に調製した D H M 2 E Q を 2 時間処理後、 $20 \text{ng}/\text{ml}$

51

の TNF- $\alpha$  で処理した。TNF- $\alpha$  処理 30 分後に 60mm dish 中の培地をサッカー (sucker) で抜き、細胞を外用 PBS-で 2 回洗浄し cold PBS-を 1ml 入れ、ラバーポリスマンを用いて細胞をはがし(2 回)、16ml 遠心チューブに入れ、2 枚の 60mm dish から 16ml 遠心チューブに細胞を集め、1,000rpm で 5 分間遠心にかけ、上清を除去した。これに cold PBS-を 700  $\mu$ l 入れ、細胞をビッベッティングしてから 1.5ml エッペンドルフチューブに集め(2 回)、3,600 rpm で 6 分間遠心にかけ、上清を除去した。以下の操作は氷中で行った。buffer A (10 mM HEPES : pH 7.9, 1.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) を 400  $\mu$ l に懸濁し、ポルテックスで振付した後 15 分間静置し、13,000 rpm で 6 分間遠心にかけ上清を除去した。また buffer A を 400  $\mu$ l ずつ加え、13,000 rpm で 6 分間遠心にかけ上清を除去した。次に、集めた核を 40  $\mu$ l の buffer C (20 mM HEPES-KOH: pH 7.9, 25% グリセロール, 420 mM NaCl, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) に懸濁させ、20 分間静置した後、13,000 rpm で 6 分間遠心にかけ、上清をエッペンドルフチューブに回収し、核抽出物とした。

## 1-2 プローブの調製

4  $\mu$ l の 1.76 pmol/ $\mu$ l oligonucleotide (Promega; Madison, WI)、2  $\mu$ l の 10  $\times$  T4 PNK buffer (500 mM Tris-HCl : pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT) 及び 10  $\mu$ l の 蒸留水を混ぜ、さらに、2  $\mu$ l の [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP、2  $\mu$ l の T4 PNK を加え、37 °C で 10 分間インキュベート後、80  $\mu$ l の TE buffer (10 mM Tris-HCl : pH 8.0, 1 mM EDTA) を加えて反応を停止させた。

次に、Nick column をスタンドに取り付け、カラムの下に廃液びんを置き、上下のキャップをはずして、カラムに充填してある TE buffer を廃液びんに回収した。3 ml 程度の蒸留水を壁を伝わらせてカラムに加え、廃液びんに回収した。ここで、100  $\mu$ l のラベル化した DNA 溶液を、壁に伝わらないようにしてカラムにのせた。下に 1.5 ml エッペンドルフチューブを準備して 400  $\mu$ l の蒸

52

留水をカラムに加え、出てきた溶液をエッペンドルフチューブに回収した (fraction 1)。下に新しいエッペンドルフチューブを準備し、さらに 400  $\mu$ l の蒸留水をカラムにのせ、出てきた溶液を fraction 2-labeled oligonucleotide)。滴定が終わったらキャップを閉め、ガイガーカウンターでカラムと fraction 1, fraction 2 をそれぞれ測定し、fraction 2 > カラム > fraction 1 となることを確認した。  
使用の際は精製した標識された DNA プローブを約 3  $\times$  10<sup>4</sup> cpm/ $\mu$ l に蒸留水で希釈した。

10 DNA プローブの塩基配列は以下の通りである。  
5'-ATGTAGGGACTTCCAGGC-3' (配列番号 3, J. Biol Chem., 277, 24625-24630, 2002)

1-3 結合反応 (binding reaction) よりグル (gel) 電気泳動 5  $\times$  binding buffer (375 mM NaCl, 75 mM Tris-HCl : pH 7.0, 7.5 mM EDTA, 7.5 mM DTT, 37.5% グリセロール, 1.5% NP-40, 1.25 mg/ml BSA) を 4  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/ml poly dI-dC (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) を 1  $\mu$ l, 核抽出物をタンパク量 5  $\mu$ g 分に、全量が 17  $\mu$ l になるようには水をくわえた。これに 3  $\mu$ l の DNA プローブを加え、混和してから 25 °C で 20 分間インキュベートした。その後、20  $\mu$ l の反応液を 4% ポリアクリルアミドゲルのウェルに移し、0.25  $\times$  TBE buffer を用いて、150V で泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、フィルムに感光させた。

## 2. 結果

D H M E Q を処理していないコントロール細胞では TNF- $\alpha$  处理 30 分後に NF- $\kappa$ B と DNA の結合を示すバンドが観察されたが、D H M E Q で処理した細胞では、NF- $\kappa$ B と DNA の結合は濃度依存的に阻害され、10  $\mu$ g/ml の濃度で NF- $\kappa$ B と DNA の結合は完全に阻害された (図 1-5)。

したがって、D H M E Q は TNF- $\alpha$  によって誘導される NF- $\kappa$ B

26

の活性化を阻害するということが示された。

＜実施例 10＞

D H M E Q のヒト乳癌細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍効果  
ヒト乳癌細胞株 MCF-7 (NF- $\kappa$  B 非恒常的活性化腫瘍) を D H M  
E Q : 10, 50  $\mu$  g/ml 下に 24, 48, 72 時間培養し、増殖抑制効果  
を検討したところ、コントロールに比較して 10  $\mu$  g/ml では 24 時  
間で 39%, 48 時間で 25%, 72 時間で 17% の細胞が生存し、  
50  $\mu$  g/ml では 24 時間以降生存細胞は認められなかつた(図 16)。  
濃度及び時間に依存的に細胞増殖が抑制された。

以上の実験結果からは、D H M E Q は時間依存性に癌細胞増殖  
を抑制するが、短時間では比較的高濃度でもアボトーシスの誘導  
効果は少なく、抗癌剤とは異なる機構を有していることがわかる。  
これは、D H M E Q を生体内で副作用の少ない薬剤として用いる  
ことができるこことを示唆している。

実験方法の詳細は以下のとおりである。  
MCF-7 を 6 穴プレートに  $1 \times 10^4$ /ウェルで播種し、翌日 D H M E  
Q : 10, 50  $\mu$  g/ml の培地 (5ml) と各々の濃度の D H M E Q と等量  
の DMSO (D H M E Q の溶解に使用) のみのコントロール培地 (5ml)  
に上清を変えた。各々の群は 3 ウェルずつで行った。ここを 0 時  
間とし、24, 48, 72 時間培養した後にトリプシン (trypsin) + EDTA  
で細胞を剥がし、トリパンブルー (trypan blue) で細胞数を計測  
して、平均値と標準偏差を算出した。各々、DMSO のみのコントロ  
ール細胞との比較で、データを出し、プロットした。

＜実施例 11＞

D H M E Q のヒト乳癌細胞に対する *in vivo* 抗腫瘍効果  
SCID マウス (日本クレア) 皮下腫瘍モデルに 4mg/kg の D H M E  
Q を週 3 日投与し、経時的に腫瘍体積を測定して、腫瘍増殖抑制効  
果を検討した。また、マウスの体重も同時に測定した。その結果、  
有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた(図 17)。マウスの

死亡、体重減少は見られなかつた。

実験方法の詳細は以下のとおりである。

- 6 週令の SCID マウス背部皮下に PBS 100  $\mu$  l に浮遊させた 1 ×  
10<sup>6</sup> の MCF-7 を接種した。D H M E Q は 0.5% メチルセルロース液  
6 (メチルセルロース：ナカライテスク) に 200  $\mu$  l で 4mg/kg となる  
よう懸濁した。薬剤含有液もしくは 0.5% メチルセルロース液  
を MCF-7 接種翌日より週 3 回、200  $\mu$  l を腹腔内投与した(各群 8  
匹)。腫瘍の長径および短径を 7 日おきにノギスで測定し、(長径)  
×(短径)<sup>2</sup> / 2 で腫瘍体積を算出した。同時に体重も測定した。
- 既存の乳癌治療薬の動物実験における腫瘍増殖抑制効果につ  
いては、いわゆる抗癌剤では、多くのデータがある。しかし、本  
薬剤の有効性を類似の機構を有する薬剤と比較する場合、近年そ  
の腫瘍増殖抑制における有効性が明らかとなつて いる抗炎症剤  
COX-2 阻害剤が妥当である。COX-2 阻害剤では、MCF-7 に対する有  
効性の報告はみられないが、他の MCF-7 同様に頻用される癌細胞  
の増殖抑制効果(図 18 : ルイス肺 (Lewis lung) 腫瘍と、HT-29  
に対する COX-2 阻害剤セレコキシブ (celecoxib; Pfizer) の  
有効性を示す)と比較すると少なくとも同等以上の効果があ  
る結論できる。実験方法は以下の通りである(Cancer Res., 60,  
20 1306-1311, March 1, 2000.)。ルイス肺腫瘍 10<sup>6</sup> 個を C57/B16 マ  
ウスの後肢に接種し、接種日からセレコキシブ (G. D.  
Searle/Monsanto Co. 提供) をおのおの 160, 480, 1600, 3200ppm  
で混合した餌を与えた群 (n=20/group) の腫瘍体積を  
plethysmometer を用いて週 2 回測定した。HT-29 ヒト大腸癌細胞  
26 株 10<sup>6</sup> 個をヌードマウスの後肢に接種し、腫瘍体積が 100mm<sup>3</sup> に達  
した時点から 160ppm で経口投与し、週 1 回測定した。データは  
mean ± SD。
- 以上のことから、D H M E Q はアボトーシス非依存性の強い抗  
腫瘍効果を有することがわかつた。また、その低副作用性が示唆

55

された。従つて、DHMEQは、乳癌の原発巣の増殖抑制、原発巣から他の組織への癌の転移に効果があるのみならず、予後の乳癌の転移を抑制したり、乳癌を予防するのに有効であることがわかった。

6 現在、乳癌の予防薬として唯一使用されているのは抗エストロゲン利セキシフェン(tamoxifen; AstraZeneca)である(北米で認められている。わが国ではその有用性が確認されておらず、使用は認められていない)。タモキシフェンの作用機序はエストロゲン受容体に結合し、女性ホルモンエストロゲンの結合を拮抗阻害することにある。従つて、タモキシフェンによる発癌予防効果はホルモン感受性の乳癌のみに限られる。ホルモン非感受性の乳癌における効果は予防できない。また、タモキシフェンには子宮体癌を発生させる副作用がある。ホルモン療法剤以外に乳癌腫瘍抑制作用を示すものはまだない。本薬剤は従来の強い細胞障害性を有する薬剤とは異なる機序を有する。従つて、母胎的にがん予防に使用される可能性がある。さらに本薬剤によるNF-κBの非活性化はNF-κB同様に炎症の中心的なメカニズムであるCOX-2の産生もそのカスケードの上流において阻害する。

まとめ：

- 20 1) 本発明の薬剤は毒性が極めて低いことより、抗癌剤などと全く異なる利点を有する。
- 2) ホルモン感受性癌のみを対象とするホルモン療法とともにそのスペクトラムにおいて大きく異なる。以上より、臨床的に考慮して新規性が高い。
- 26 3) 加えて、最近注目を集め乳癌の化学予防の観点からも、新規メカニズムを有する薬剤として有望である。

＜実施例12＞

DHMEQの急性毒性試験は以下のように行つた。DHMEQ

56

を10%DMSO saline + Tween80 1滴に溶解し、ICRマウスの腹腔に投与し、24時間後マウスの生死、状態を調べた。その結果、0、156, 0, 313, 0, 625, 1, 25, 2, 5mg/mouseでは生存、5mg/mouseでは即日死亡した。即日死亡マウスは解剖所見の結果、臓器の沈着有、腹水少量であった。5mg/mouseは約250mg/kgにあたる。急性毒性LD50は187.5mg/kgと算出した。

＜実施例13＞

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩の悪液質に対する効果を検定するため、悪液質を誘発したBALB/cヌードマウスをヒト悪液質患者のモデルマウスとして用いた。この際、悪液質症の膀胱には、アンドロゲン非感受性ヒト前立腺癌細胞株JCA-1を用いた。

DHMEQによるNF-κB活性の阻害効果を測定するため、NF-κBの転写活性を指標に、様々な濃度のDHMEQに対するNF-κB活性を測定した。レポーターには、NF-κB結合配列を6コピ一繰り返して有するプロモーターの下流に、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして有するベクターコンストラクト(p6kb-Luc)を用いた。このレポータープラスマミドを、GenePOETER(商標: Gene Therapy Systems)を用いて、JCA-1細胞にトランسفェクトした。トランسفェクションの14時間後に、細胞培地に2.5, 5, 10, 20, 40μg/mlのDHMEQを添加し、さらに8時間培養して、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールとして、何も処理を行わないものと、DHMEQを含有しない浴媒(ここではDMSO)のみで処理したものと26とり、同時に実験を行つた。それぞれのルシフェラーゼ活性を測定し、その絶対値をそれぞれの殺細胞率で標準化して表した。なお、全ての実験は独立に3回行い、平均値と標準偏差を算出した。結果を図19に示す。

図19に明らかのように、細胞内のNF-κB活性は、投与した

57

D H M E Q 濃度が高くなるほど、阻害効果が有意に大きくなつた。このことから、D H M E Q は、J C A - 1 細胞の N F - κ B 活性を、選択的に阻害することが明らかとなつた。

&lt;実施例 1 4 &gt;

6 D H M E Q の効果を測定するため、上記ヌードマウスを用いて、感染質モルマウスを作製した。6 週令のヌードマウス側腹皮下に、P B S 100 μl に懸濁した  $1 \times 10^7$  個の J C A - 1 細胞を接種した(以下、担癌マウスと呼ぶ)。接種されたマウスは、接種 14 日後、腫瘍できる位に腫瘍が増大した時点 10 で、ランダムに 3 つのグループに分け、グループ 2 (Gr2; 13 匹) には 8 mg/kg 体重の D H M E Q を毎日投与し、グループ 3 (Gr3; 13 匹) には DMSO を毎日投与し、グループ 4 (Gr4; 11 匹) には何も投与しなかつた。なお、J C A - 1 細胞を接種していない正常ヌードマウスをグループ 1 (Gr1; 14 匹) とした(以下、正常マウスと呼ぶ)。D H M E Q を投与した翌日より、1 日おきに、体重(図 20 )と臍周径より算出した臍周径重量(図 21 )を測定した。D H M E Q 投与開始後 26 日目に、全てのマウスを解剖し、腫瘍の重量(図 22 )、精巣周囲の脂肪の重量(図 23 )、肝臍筋の重量(図 24 )、ヘマトクリット値(図 25 ; 血中細胞成分の全血液重量に対する容積の割合。血液を遠心することによって測定できる。)を測定し、グループごとに測定値を算出した。

実験結果を以下に述べる。まず、8 mg/kg 体重の D H M E Q 投与群(Gr2)は、非投与群(Gr3, Gr4)に対し、有意に体重の減少が抑制された(図 20 )。しかし、上記の濃度の D H M E Q では、臍周径の退縮効果は観察されなかつた(図 21 、図 22 )。実験終了時(D H M E Q 投与開始後 26 日目)における測定では、精巣周囲の脂肪の重量(図 23 )や肝臍筋の重量(図 24 )は、D H M E Q 投与群(Gr2)において、非投与群(Gr3, Gr4)に対し、有意に重量の減少が抑制された。また、ヘマトクリット値では、

58

D H M E Q 投与群(Gr2)において、非投与群(Gr3, Gr4)に対し、有意に回復傾向にあつた。実験終了時に各群に各臓器の重量を測定し、比較検討したが、D H M E Q の投与による各臓器への好ましくない影響は認められなかつた(図 26 )。

6 以上より、J C A - 1 細胞の接種によって癌を生じ、悪性質症状を引き起こしたマウスに対し、D H M E Q を投与することにより、生じた癌の大きさや重量に影響を与えない濃度であつても、悪性質症状の緩和や抑制が観察された。

<実施例 1 5 >

10 D H M E Q による多発性骨髓腫(MM)細胞株の構成的 N F - κ B 活性化阻害作用

15 2 × 10<sup>4</sup> 個の MM 細胞株 KMM1、RPM18226、U266 を 10 μg/ml の D H M E Q で 12 時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例 4 の(1)と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、D H M E Q の N F - κ B 阻害作用を検討した。この結果、MM 細胞株において D H M E Q 処理により N F - κ B によるシグナルが消失することが明らかとなつた(図 27 の A)。なお、TNF 処理した Jurkat(Jurkat+TNF)は陽性コントロールとして用いた。図中の「comp」は非標識プローブによる競合阻害実験の結果で、シグナルが N F - κ B 結合配列に特異的であることを示す。

20 次に、MM 細胞株 KMM1、RPM18226、U266 を 10 μg/ml の D H M E Q で処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例 4 の(1)と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、時間経過による N F - κ B 阻害作用を検討した。その結果を図 27 の B に示す。これにより、D H M E Q 処理後 1 時間ではほぼ N F - κ B の活性化は阻害され、16 時間の時点においても N F - κ B の活性化阻害が持続されるのが確認できた。

次に N F - κ B の活性化阻害効果をレポーターアッセイを用いて調べた。まず、6kB-Luc plasmid DNA を MM 細胞株 KMM1、RPM18226、

69

U266 にトランスクエクションにより導入した ( $2 \times 10^6$  個細胞 / ノートラントスフェクションのスケールで、DMRIEC (INVITROGEN) を用いてトランスクエクトした)。12 時間後より  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の DHMEQ で 12 時間処理を行い、DHMEQ による NF- $\kappa$ B の転写抑制効果を検討した。その結果を図 27 の C に示す。これにより、DHMEQ で処理した WT-1 及び TL-0m1 は、未処理のものに比べて NF- $\kappa$ B の転写が約 50% 抑制されることが明らかとなった。従って、DHMEQ による NF- $\kappa$ B の転写抑制効果が示された。

&lt; 実施例 16 &gt;

10 DHMEQ による多発性骨髓腫 (MM) 細胞株の増殖阻害作用と細胞増殖阻害に対する DHMEQ の濃度の影響を調べるために、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 を用いて実施例 5 の (1) と同様の方法により、細胞の生存率を判定した。その結果を図 28 の A に示す。なお、図中の横軸は DHMEQ の濃度を示し、縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ 処理 / 未処理)  $\times 100\%$  を示す。図 28 の A に示すように、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ の濃度に比例して細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。

15 次に、DHMEQ の増殖抑制の時間経過による影響を調べたため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 を用いて、実施例 5 の (2) と同様の方法により、時間経過に対する増殖阻害作用を MTT アセイ法により検討した。その結果を図 28 の B に示す。なお、図中の横軸は DHMEQ の濃度を示し、縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ / 未処理)  $\times 100\%$  を示す。図 28 の B に示されるように、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ の処理時間に比例して細胞増殖が抑制されたことことが明らかとなった。

また、DHMEQ による MM 細胞へのアボトーシスの誘導について調べたため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 に対し、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 0、24、48 時間培養を行い、アネキシン V 染色によりアボトーシスの検討を行った。その結果を図 28 の C に示す。

60

これにより、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ によりアネキシン V 陽性細胞が生じ、アボトーシスが誘導されていることが明らかとなった。

また、DHMEQ による MM 細胞株のアボトーシスの誘導を確認するため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 に対し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 72 時間培養を行い、ヘキスト染色して核の濃縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアボトーシスの検定を行った。その結果を図 28 の D に示す。MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 においては、DHMEQ 处理により核の断片化した像が観察された。以上の結果から、DHMEQ は、ATL 細胞のアボトーシスを誘導することを確認した。

&lt; 実施例 17 &gt;

10 DHMEQ による多発性骨髓腫 (MM) 患者細胞の増殖阻害作用と細胞増殖阻害に対する DHMEQ の濃度を調べるために、MM 細胞株 MM1、MM2、MM3 を患者骨髓より分離し、DHMEQ  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 48 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。その結果を図 29 の A に示す。なお、コントロールとして正常末梢血より分離した単核球 (PBMC) を用いた。図中の縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ 处理 / 未処理)  $\times 100\%$  を示す。図 29 の A に示されるように、多発性骨髓腫 (MM) 患者からの MM 細胞は DHMEQ の濃度に比例して増殖が抑制されたのに対し、正常末梢血より分離した単核球への影響はほとんど認められなかった。

このことから、DHMEQ は、MM 患者の MM 細胞に対しては増殖阻害活性をもつが、正常単核球に対してはほとんど作用せず、副作用の少ない医薬成物として機能しうるこどが明らかとな

65

61

つた。

また、D H M E Q による多発性骨髓腫 (MM) 患者細胞へのアボトーシスの誘導について調べるため、多発性骨髓腫 (MM) 患者細胞に対し、D H M E Q  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 12 時間培養を行い、ヘキスト染色して核の濁縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアボトーシスの検討を行った。その結果を図 29 の B に示す。図 29 の B に示されるように、多発性骨髓腫 (MM) 患者からの MM 細胞は D H M E Q 处理によりアボトーシスが誘導され、核が断片化することを確認した。

- 10 <実施例 1.8> D H M E Q によるホジキンリンパ腫 (HL) 細胞株の構成的 NF- $\kappa$ B 活性阻害作用  
2  $\times 10^4$  個の HL 細胞株 KMH2、L428、L540、HDLM2 およびコントロール細胞株 K562 を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D H M E Q で 12 時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例 4 の (1) と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、NF- $\kappa$ B 阻害作用を検討した。その結果、HL 細胞株では D H M E Q により NF- $\kappa$ B のシグナルがほぼ消失することが明らかとなつた (図 30 の A)。なお、細胞株 K562 (骨髄球系の白血病細胞株) は NF- $\kappa$ B の構成的活性化を認めない細胞株であり、ネガティブコントロールとして用いた。一方、TNF 处理した Jurkat (Jurkat+TNF) はがジティブコントロールとして用いた。図中の 「comp」 は非標識プローブによる競合阻害実験で、シグナルが NF- $\kappa$ B 結合配列に特異的であることを示す。
- 20 次に、HL 細胞株 KMH2、L540 を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D H M E Q で処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例 4 の (1) と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、時間経過による NF- $\kappa$ B 阻害作用を検討した。その結果、処理後 1 時間では NF- $\kappa$ B の活性化は阻害され、16 時間の時点においても NF- $\kappa$ B の活性化阻害が持続されたのが確認できた (図 30 の B)。

62

- 6 そこで、HL 細胞株 KMH2、L428、L540、HDLM2 において構成的に活性化されている NF- $\kappa$ B の構成因子について検討を行った。  
6 実施例 1 に記載の方法と同様に NF- $\kappa$ B の p50、p65、c-Rel に対する抗体を用い、スーパーシフトを行った。その結果を図 30 の C に示す。図 30 の C に示すように、特に p60 に対してスーパーシフトが観察され、HL 細胞株のいずれにおいても p50 が複合体中に存在することが確認できた。
- 10 L428 及び KMH2 においては、D H M E Q 処理後も弱いシグナルが残存する。そこで、これらのシグナルが D H M E Q 抵抗性の NF- $\kappa$ B の特異的な構成因子を有しているかどうかを調べた。また、HL 細胞株 KMH2、L428-L540、HDLM2 を  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の D H M E Q で 12 時間処理し、残存する NF- $\kappa$ B の成分を NF- $\kappa$ B の p50、p65、c-Rel に対する抗体を用いて、実施例 1 に記載の方法と同様にスーパーシフトを行った。その結果を図 30 の D に示す。図 30 の C と同様の結果が得よう、残存する成分は主に p50 で図 30 の C と同様の結果が得られ、D H M E Q に対して抵抗性を示す特有の構成因子はないと考えられた。
- 20 <実施例 1.9>  
D H M E Q による抗腫瘍作用増強効果  
カシプトテシン (CPT)、ダウノマイシン (DNR)、エトポシド (ETP) を抗腫瘍剤として用い、D H M E Q による抗腫瘍作用増強効果を検討した。抗腫瘍作用およびその増強効果は実施例 5 の (2) に記載の MTT アッセイ法により検討した。その結果を図 31 に示す。なお、本実施例において、細胞は KM12 を用いた。図中の横軸は各抗腫瘍剤の濃度および D H M E Q 濃度を示す。各々抗腫瘍剤の濃度を 3 段階とし、それぞれについて D H M E Q のみ、抗腫瘍剤のみ、両者併用で検討した。D H M E Q ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の濃度で

63

使用し、処理時間は 48 時間とした。被検は未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち(処理 / 未処理) × 100% を示す。図 3-1 の A は抗腫瘍剤としてカンプトテシン(CPT)を、B は抗癌剤としてダノマイシン(DNR)を、C は抗腫瘍剤としてエトボシド(Etop)を用いた。この結果、いずれにおいても D H M E Q は抗腫瘍剤の効果を増強することが示された。

&lt;実施例 20&gt;

D H M E Q による抗腫瘍剤作用增强効果は抗腫瘍剤による NF- $\kappa$ B 活性化の阻害による

10 各抗腫瘍剤処理による NF- $\kappa$ B 活性化を調べるために、各抗腫瘍剤(カンプトテシン(CPT)、ダウノマイシン(DNR)、エトボシド(Etop))で腫瘍細胞を処理した時の NF- $\kappa$ B 活性化を実施例 4 の(1)に記載のゲルシフトアッセイにより調べた。その結果を図 3-2 の A に示す。なお、本実施例において、細胞は KMH2 を用いた。図中の各ペル下段は得られたシグナルを定量化し、処理前を 1 とした時の相対値を示す。図 3-2 の A に示されるように、いずれの抗腫瘍剤で処理しても処理前のものと比較して、一過的に 3 から 20 倍の NF- $\kappa$ B 活性が腫瘍細胞に生じていることが示された。

15 腫瘍細胞において、カンプトテシン(CPT)及びダウノマイシン(DNR)により誘導された NF- $\kappa$ B の構成因子を調べるため、実施例 1 に記載の方法と同様に NF- $\kappa$ B の p50、p65、c-Relに対する抗体を用い、スーパーシフトを行った。その結果を図 3-2 の B に示す。図 3-2 の B に示すように、カンプトテシン(CPT)又はダウノマイシン(DNR)で処理した腫瘍細胞において活性化 NF- $\kappa$ B は主に p50 を含んでいることが明らかとなった。

20 次に、D H M E Q による抗腫瘍剤による NF- $\kappa$ B 活性化の阻害について調べるために、各抗腫瘍剤(カンプトテシン(CPT)、ダウノマイシン(DNR))に D H M E Q を併用して腫瘍細胞を処理し

64

た時の NF- $\kappa$ B 誘導を実施例 4 の(1)に記載のゲルシフトアッセイを行い、時間経過による NF- $\kappa$ B 阻害作用を検討した。その結果を図 3-2 の C に示す。なお、本実施例において、細胞は KMH2 を用いた。図中の各ペル下段は得られたシグナルを定量化し、処理前を 1 とした時の相対値を示す。図 3-2 の C に示されるように、いずれの抗腫瘍剤で処理しても NF- $\kappa$ B 誘導は D H M E Q 併用により強く抑制された。

&lt;実施例 21&gt;

ATL 細胞株を腹腔内に接種した SCID マウスを用い、in vivo での D H M E Q の効果を調べた。まず、SCID(Male C.B17-scid/scid scid/scid)マウス(CB17 系統、5 週齢、雄：SLC Japan, Inc (Shizuoka, Japan))を 1mg の IL-2 レセプター抗体 (TM-β1; J. Immunol. 147: 2222-2228, 1991) で 3~5 日間処理し、3~4 × 10<sup>7</sup> の ATL 細胞株 MT-2 を腹腔内に接種した。その後、それらのマウスに 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose; Sigma)液に溶解した D H M E Q 4ng/kg-体重又は 12mg/kg-体重を 1ヶ月にわたり週 3 回腹腔内に投与し、生存率およびマウスの状態を観察した。对照群には D H M E Q を含まない 0.5% CMC 液を同様に 1ヶ月にわたり週 3 回腹腔内に投与した。その結果を図 3-3 に示す。なお、生

10 存曲線はカブランマイヤー(Kaplan and Meier)法により計算し、統計学的有意差は Cox-Mantel テストにて判定した。図 3-3 に示されるように、D H M E Q 4ng/kg 投与群 (D H M E Q (+)) は実験開始後、約 200 日で 6 匹中 4 匹が生存し、これに対し、对照群 (D H M E Q (-)) は 5 匹全例が死亡し、統計学的に有意差を得た (Cox-Mantel テスト；p<0.05)。また、D H M E Q 12mg/kg 投与群 (D H M E Q (+)) は実験開始後約 30 日で 6 匹中 5 匹生

15 存したが、これに対し非投与群 (D H M E Q (-)) は 5 匹中 4 匹が死亡し、統計学的に有意差を得た (Cox-Mantel テスト；p<0.05)。なお、投与群 (D H M E Q (+)) はマウスの体重等に異常は認め

65

ず、DHMEQ 4mg/kg の 3 倍量を用いても毒性は認めなかつた。この結果、DHMEQ は in vivo において移植 ATL 細胞によるマウス個体の死比を救う (rescue) ことができる事が明らかとなつた。

## &lt;実施例 2-2&gt;

DHMEQ と放射線照射とを併用した場合の相乗効果について調べた。 $2 \times 10^6$  のヒト肺癌細胞株 PK-2 を SCID マウス (7匹) の右背部皮下に接種し、DHMEQ 12mg/kg を 1 日置きに 1 回 200μl で 5 日間腹腔内注射 (i.p.) した。その後、7 日ごとに腫瘍の長径と短径を測定し、(長径) × (短径)<sup>2</sup> × 0.6 により腫瘍体積を算出した。その結果を図 3-4 に示されるように、DHMEQ を用いると肺癌細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかとなつた。

次に、放射線効果における DHMEQ のアボトーシス増殖効果について調べた。DHMEQ 10μg/ml を 6 時間投与したヒト肺癌細胞株 Colo357 と、20Gy の放射線を照射して 6 時間にシミュレーションしたヒト肺癌細胞株 Colo357 と、20Gy の放射線を照射した直後から DHMEQ 10μg/ml を 6 時間投与したヒト肺癌細胞株 Colo357 を、それぞれアネキシン (Annexin)-V と PI(プロビジウムオダイド) で二重染色し、フローサイтомトリーアボトーシス初期段階にある細胞 (右下) を測定し、その比率を算定した。その結果を図 3-5 に示す。図 3-5 に示されるように、DHMEQ 単独ではヒト肺癌細胞株 Colo357 においてアボトーシスは誘導されなかつた。これに対して、20Gy の放射線照射した後、DHMEQ を投与した細胞では、20Gy の放射線照射のみを行つた細胞に比べ、アボトーシスの誘導能が約 3 倍増強するこどが明らかとなつた。

また、DHMEQ の放射線併用におけるヒト肺癌細胞株に対す

66

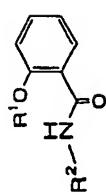
る in vitro 増殖抑制効果について調べた。 $5 \times 10^6$  のヒト肺癌細胞株 Panc-1、PK-8、Colo357 を 10cm dish にまき、2 日後に 2.5Gy 若しくは 10Gy で放射線照射を行い、続いて併用群では 10μg/ml の DHMEQ を 4 時間投与し、24 時間後に細胞数を計測した。なお、放射線照射終了後若しくは薬剤添加時を 0 時間とした。その結果を図 3-6 に示す。これにより、DHMEQ は 4 時間の薬剤接触のみで、ヒト肺癌細胞株 PK-8、Colo357 に対して十分な増殖抑制効果を有し、その効果は 2.5Gy 相当の放射線照射に匹敵した。放射線抵抗性でかつ DHMEQ 単独の効果が乏しい Panc-1 においては、放射線照射と DHMEQ との併用でおのおのの治療抵抗性が消失した。Colo357 と Panc-1 では、放射線照射との併用で DHMEQ は相乗的な増殖抑制効果を示し、2.5Gy の照射効果を 4 倍の 10Gy 相当まで増強するこどが明らかとなつた。

## 15 産業上の利用の可能性

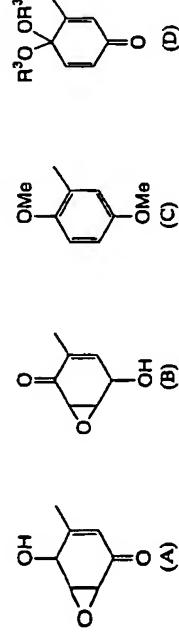
本発明によって、NF-κB の活性化を伴う症状を改善するこどができる医薬組成物を提供することができる。

明鏡の水語

1. 胞毒細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するための下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に評価される塩を有効成分として含有する医薬組成物。



(式中、R' は水素原子または C 2 ~ 4 のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup> は下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



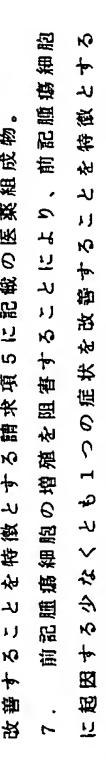
(式中、R<sub>3</sub>はC<sub>1</sub>～4のアルキル基である。)

2. 前記腫瘍細胞のアボトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
3. 前記腫瘍細胞のアボトーシスが有しないで、前記細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。

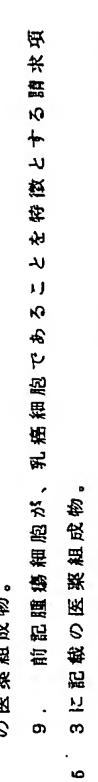
88

4. NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することを特徴とする請求項 3 に記載の医薬組成物。

5. 前記症状が、腫瘍転移であることを特徴とする請求項 3 に記載の医薬組成物。



8. 前記症状が、ホジキン病、癌悪疾質、白血病からなるグループから選ばれる症状であることを特徴とする請求項1に記載



とする請求項1に記載の医療組成物。



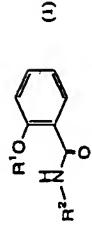
11. 前記悪疫質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状を予防または改善することを特徴とする請求項 8 に記載の医薬組成物。

12. 前記腫瘍細胞が形成する腫瘍内の血管新生を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善

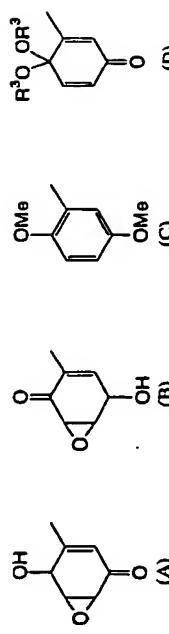
69

することを特徴とする請求項 3 に記載の医薬組成物。

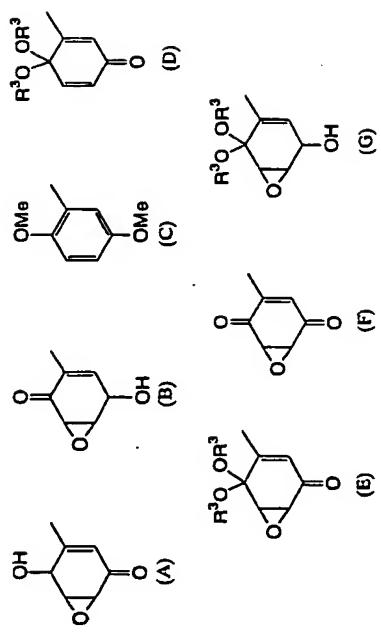
1 3 . NF- $\kappa$ B を活性化させる治療による NF- $\kappa$ B の前記活性化を阻害することにより、前記治療の効果を増大させることができる下記の一般式 (1) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有する医薬組成物。



(式中、R<sup>1</sup> は水素原子または C<sub>2</sub> ~ 4 のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup> は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。)



10 R<sup>2</sup> は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。



(式中、R<sup>3</sup> は水素原子または C<sub>2</sub> ~ 4 のアルカノイル基である。)

1 4 . 前記 NF- $\kappa$ B を活性化させる治療が、抗腫瘍剤を用いた治療であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

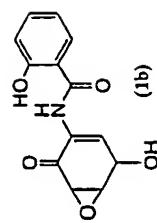
16 1 5 . 前記 NF- $\kappa$ B を活性化させる治療が、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

70

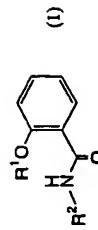
1 6 . 前記抗腫瘍剤を有効成分として含有することを特徴とする請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

1 7 . 前記抗腫瘍剤は、カンプトテン、またはダウノルビシンであることを特徴とする請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

6 1 8 . 前記化合物が下記の式 (1a) または (1b) であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。



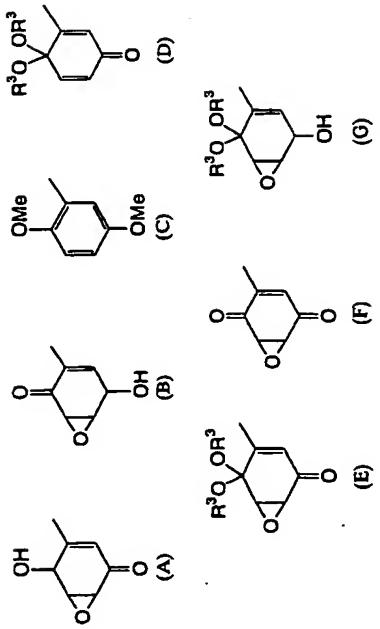
1 9 . 下記の一般式 (1) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、腫瘍細胞の増殖を阻害するための腫瘍細胞増殖阻害剤。



(式中、R<sup>1</sup> は水素原子または C<sub>2</sub> ~ 4 のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup> は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。)

16

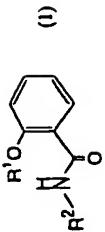
71

(式中、R<sup>3</sup>はC 1～4のアルキル基である。)

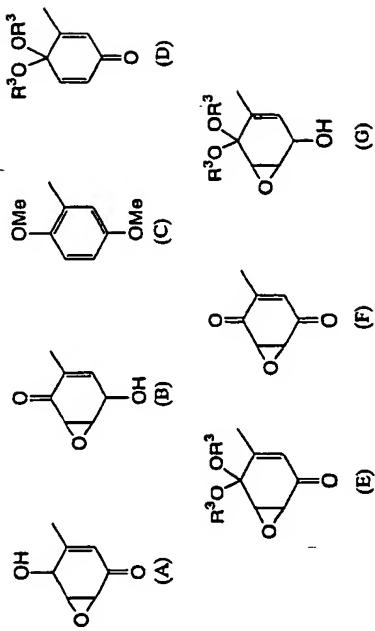
20 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項1.9に記載の腫瘍細胞増殖阻害剤。



21 下記の一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制するための接着分子発現抑制剤。

(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、

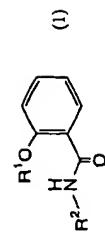
72

R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)(式中、R<sup>3</sup>はC 1～4のアルキル基である。)

22 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項2.1に記載の血管内皮細胞由来の接着分子発現抑制剤。



23 下記の一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、腫瘍細胞のアボートークシスを誘導するためのアボトーシス誘導剤。

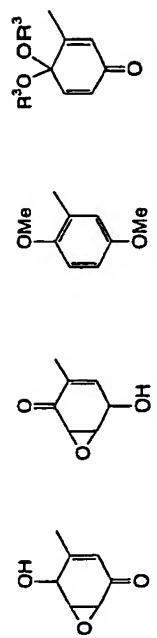


10

5

73

(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



(式中、R<sup>3</sup>はC 1～4のアルキル基である。)

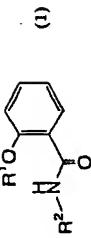
6 2 4 . 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項2 3に記載のアボトーシス誘導剤。



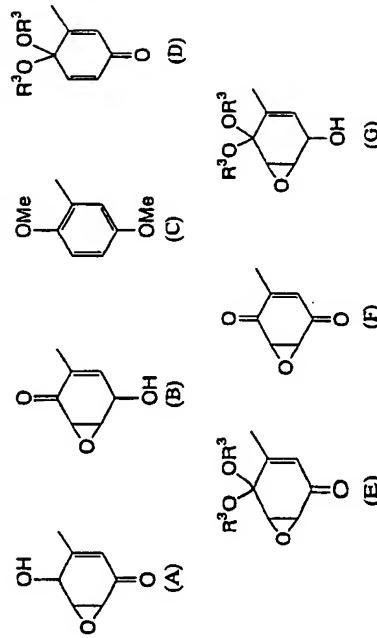
2 5 . NF-κB阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化の予防・治療剤。

10 2 6 . NF-κB阻害作用を有する化合物が下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される量である請求項2 5に記載の予防・治療剤。

74



(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

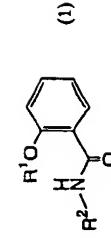


5

(式中、R<sup>3</sup>はC 1～4のアルキル基である。)

2 7 . NF-κB阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する癌の予防・治療剤。

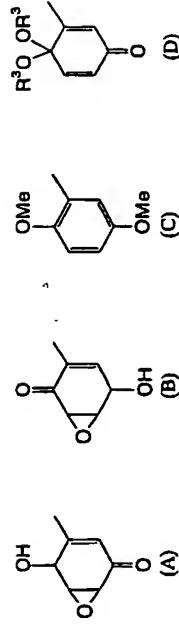
2 8 . NF-κB阻害作用を有する化合物が下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される量である請求項2 7に記載の予防・治療剤。



16 (式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、

75

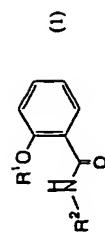
R<sup>3</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



(式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基である。)

2 9. 痛の転移抑制のために用いられる請求項27に記載の予防・治療剤。

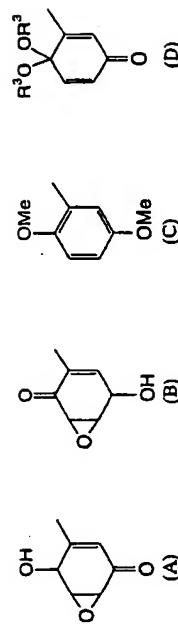
3 0. 下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する悪疫質治療剤。



10

(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

76



(式中、R<sup>3</sup>はC1～4のアルキル基である。)

3 1. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。



6

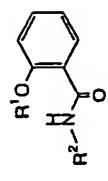
3 2. 睡病患者における悪疫質の治療剤であることを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。

3 3. 脳癌患者における悪疫質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状を予防または改善することを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。

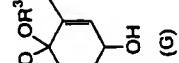
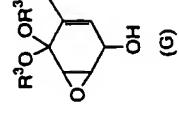
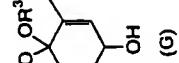
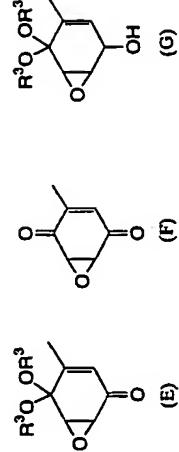
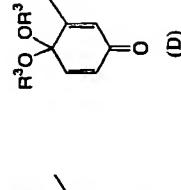
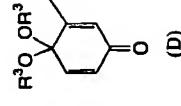
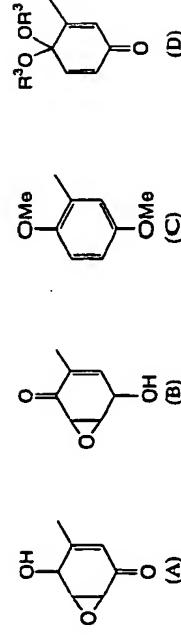
3 4. NF- $\kappa$ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する悪疫質治療剤。

3 5. 腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するたる悪疫質治療剤。

めの下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に評容される塩を用いることを特徴とする治疗方法。



(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



(式中、R<sup>3</sup>はC<sub>1</sub>～4のアルキル基である。)

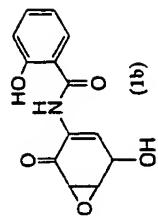
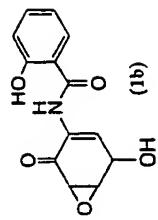
10 3 6. 前記腫瘍細胞のアボトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項3 5に記載の治療方法。

16 3 7. 前記腫瘍細胞のアボトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項3 5に記載の治療方法。

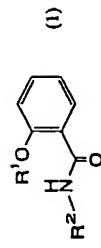
18 3 8. NF-κBの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項3 5に記載の治療方法。

求項3 5に記載の治疗方法。

- 3 9. 前記症状が、腫瘍転移、前記腫瘍細胞の増殖から生じる症状、ホジキン病、癌悪疾質からなるグループから選ばれる症状であることを特徴とする請求項3 5に記載の治疗方法。
- 6 4 0. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項3 5に記載の治疗方法。

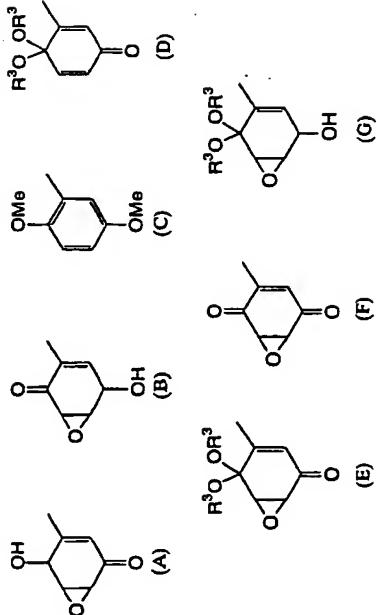


- 4 1. 血管内皮細胞と白血球との接着を阻害することにより、動脈硬化を改善するための下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に評容される塩を用いることを特徴とする治疗方法。



- 16 (式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>2</sub>～4のアルカノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

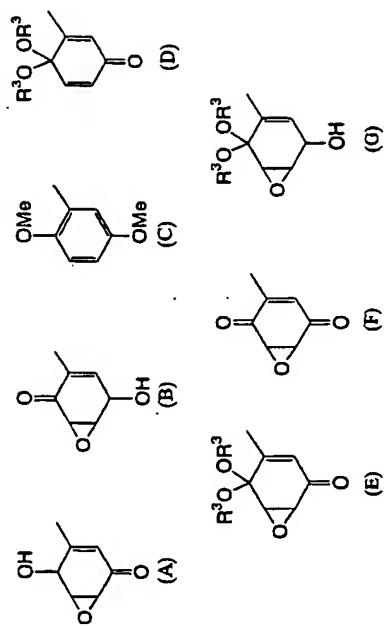
79



4 2. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項4 1に記載の治療方法。

80

(式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC 2～4のアルカルノイル基であり、R<sup>2</sup>は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



6 4 4. 前記NF-κBを活性化させる請求項4 3に記載の治療方法。

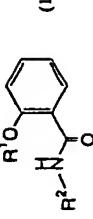
4 5. 前記NF-κBを活性化させる治療が、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であることを特徴とする請求項4 3に記載の治療方法。

10 4 6. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項4 3に記載の治療方法。



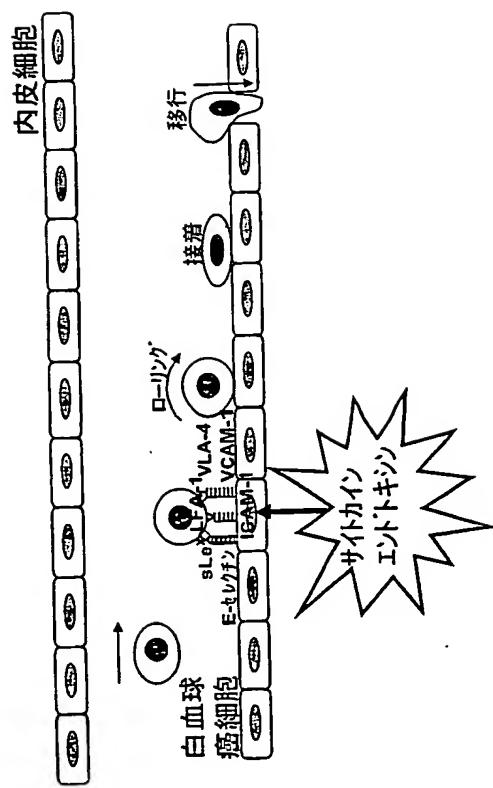
6 4 3. NF-κBを活性化させる治療を行なうステップと、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物を投与するステップとを含むことを特徴とする治療方法。

10

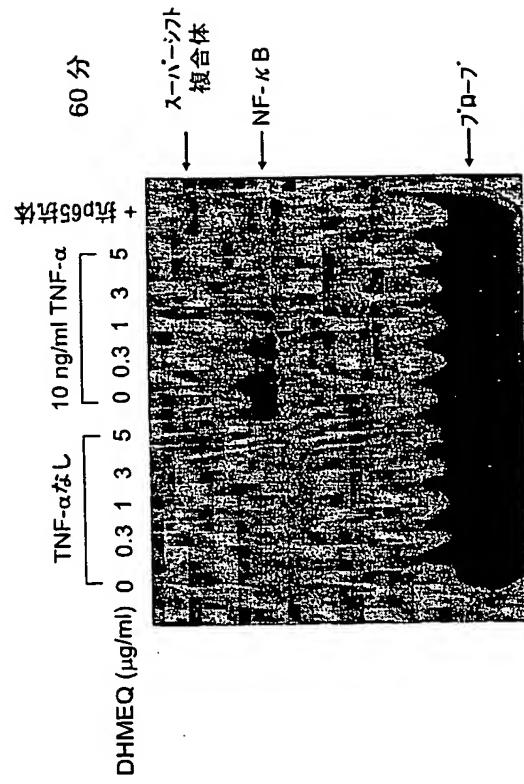


1 / 3 3

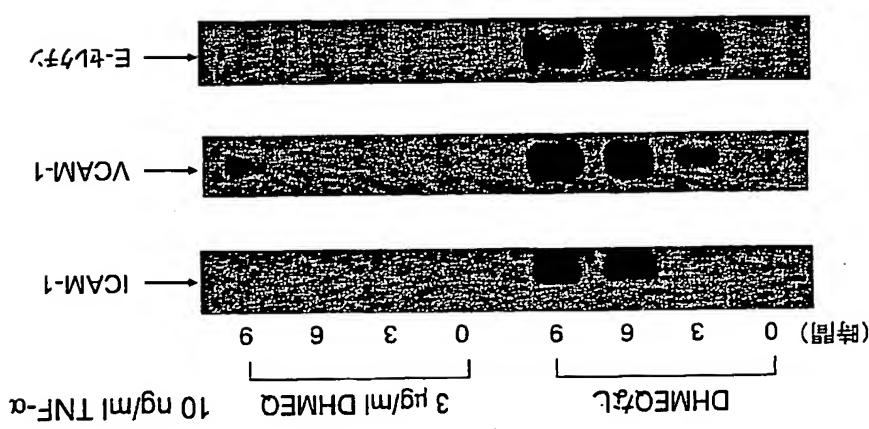
2 / 3 3



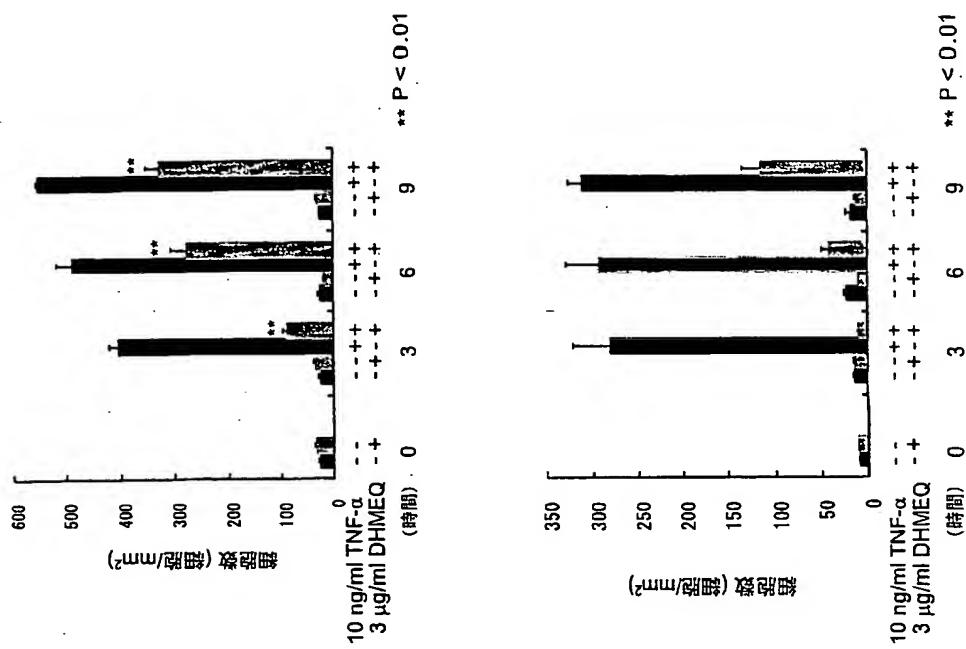
第 1 図



第 3 図

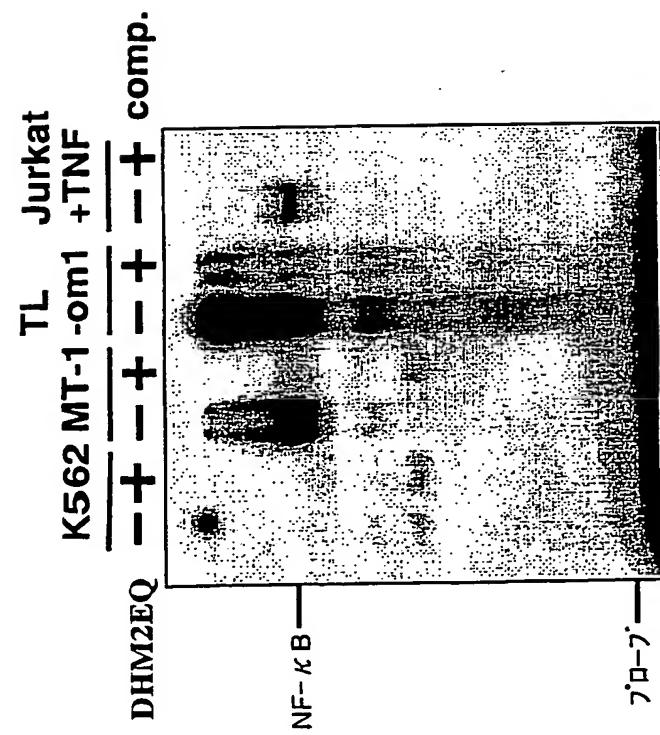


第 4 図



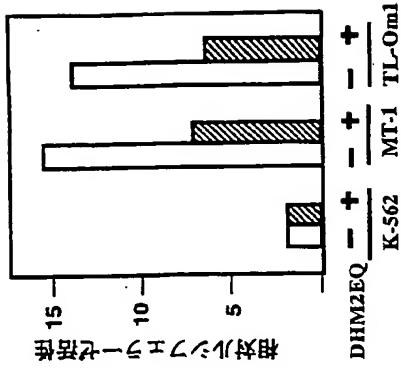
第 4 図

6 / 33

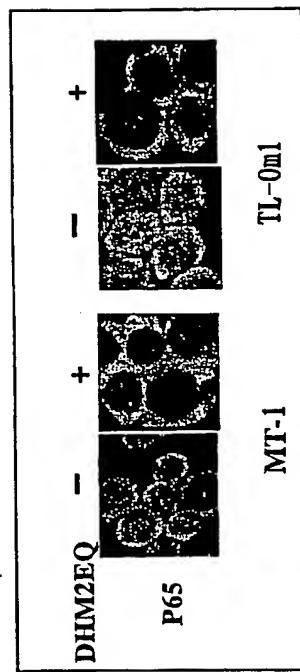


第 5 図

6 / 33

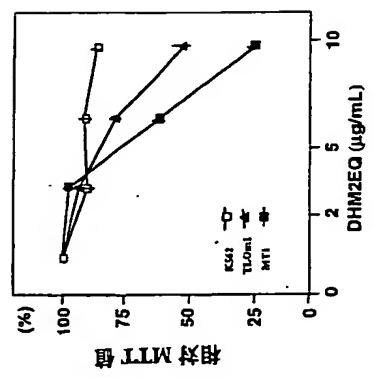


第 6 図



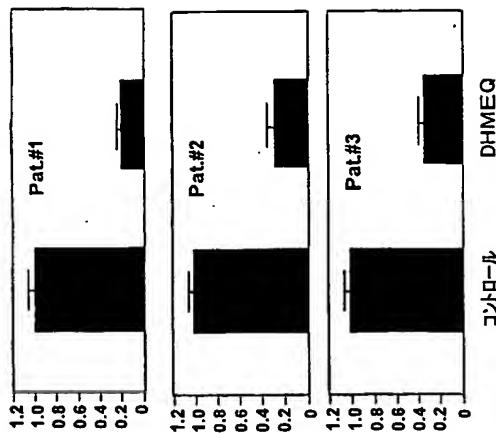
第 7 図

7／33

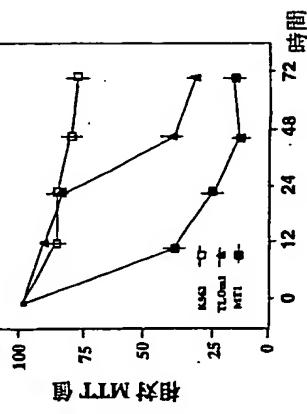


第 8 図

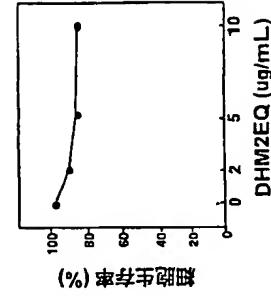
8／33



第 10 図

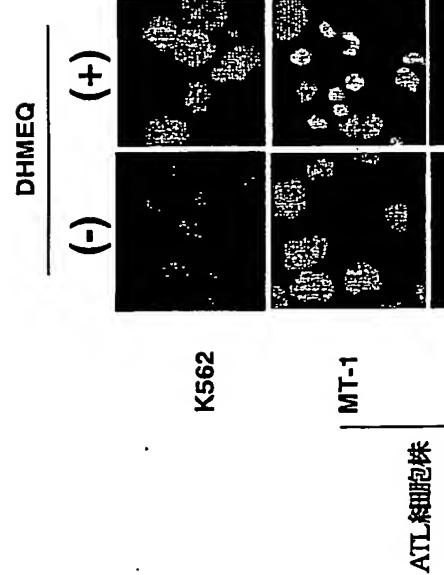


第 9 図



第 11 図

9 / 33

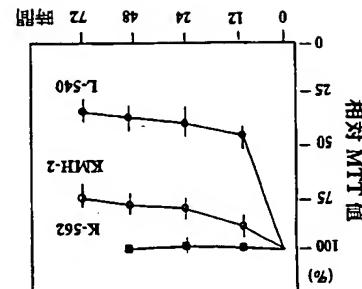
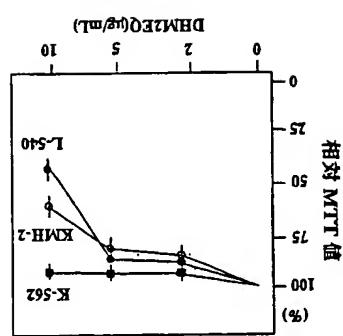


第 1.2 図

(1) 本発明の細胞株に対する  
増殖抑制効果一線図の解説

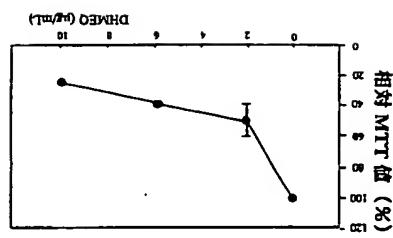
10 / 33

② 本発明の細胞株に対する  
増殖抑制効果一線図の解説

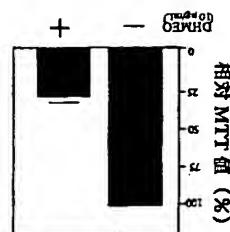


第 1.3 図

11/33

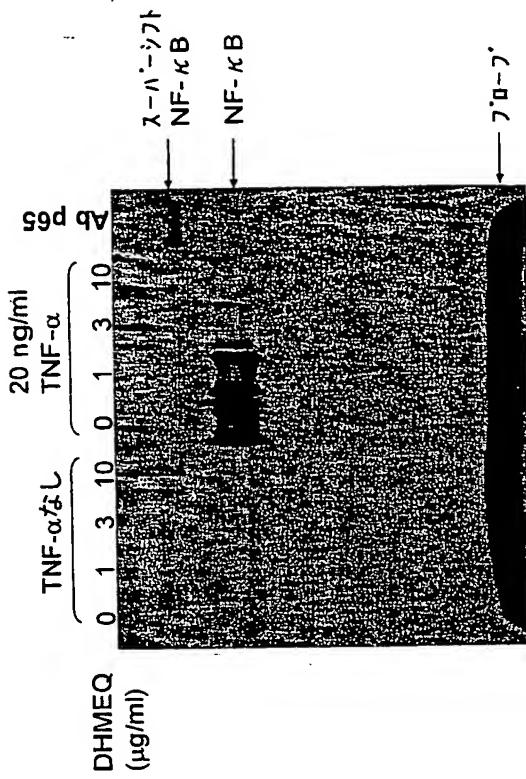


① 擬腫抑効果



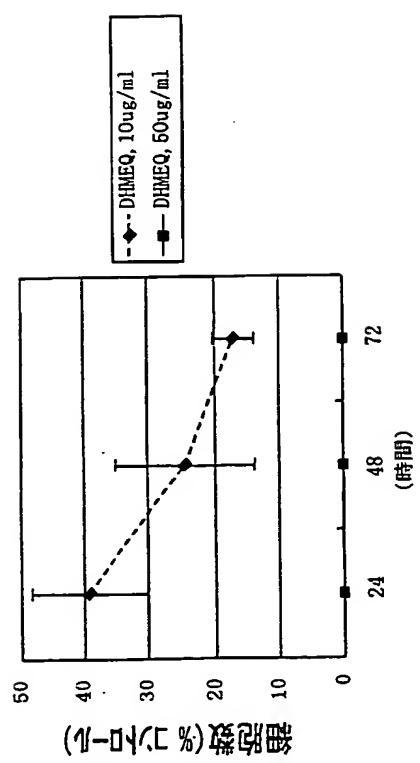
第 14 図

12/33

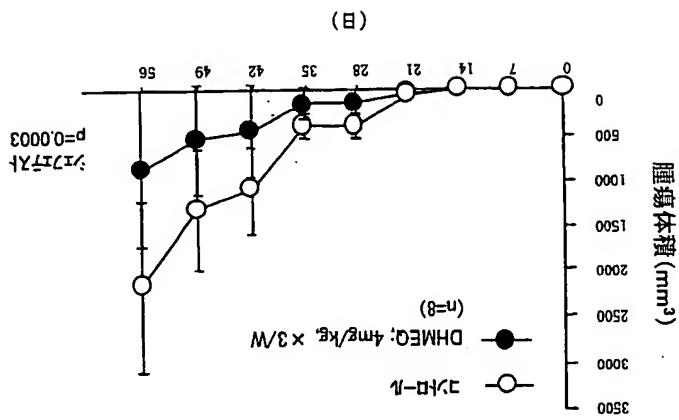


第 15 図

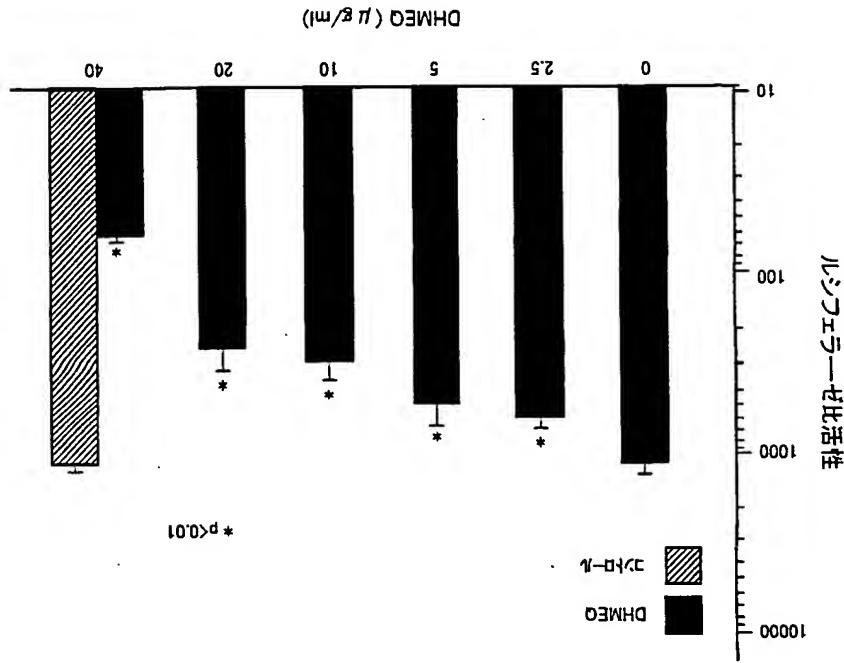
第 16 図



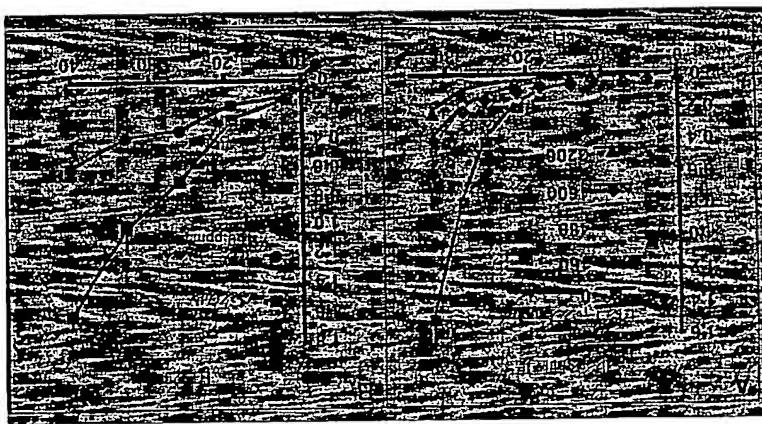
第 17 図



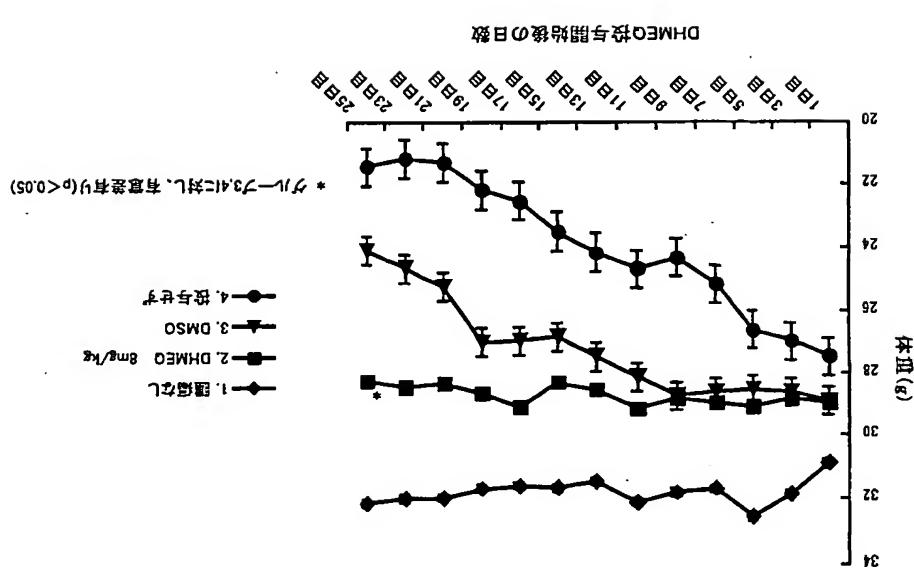
第 19 図



第 18 図

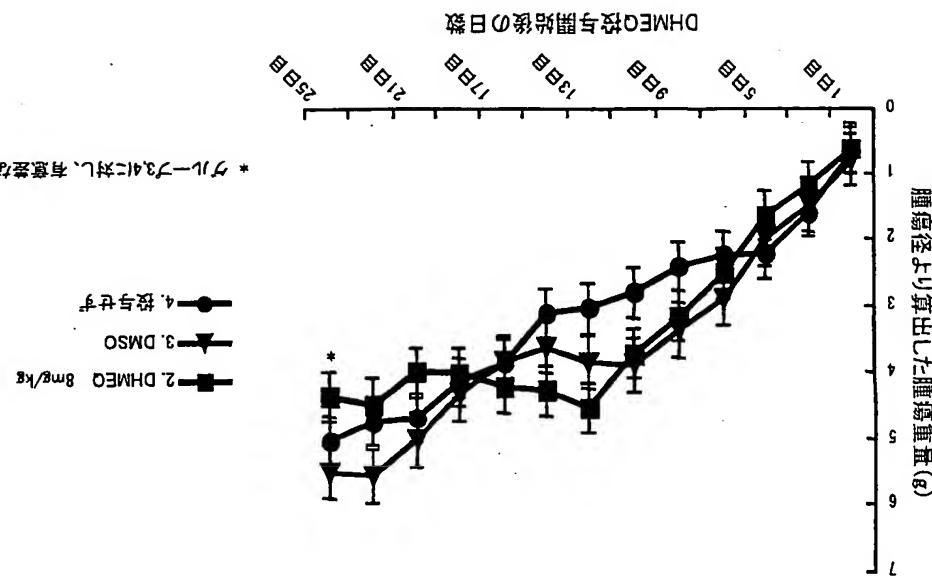


17/33



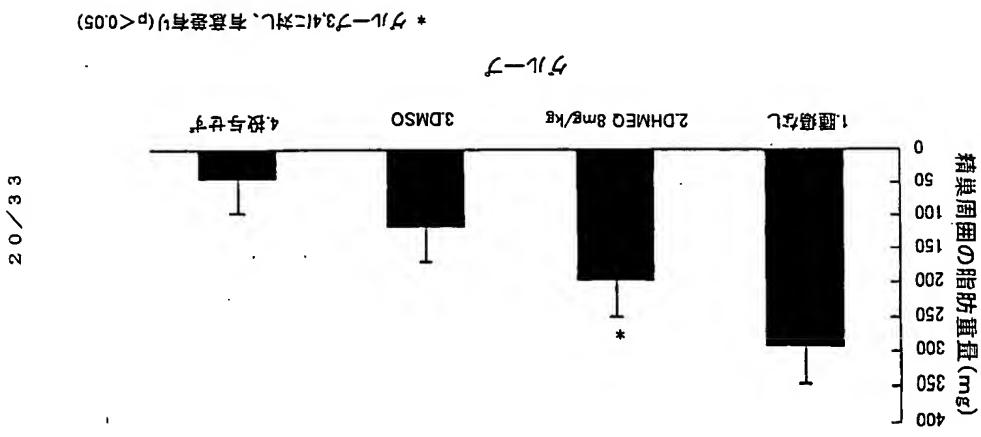
第 20 図

18/33

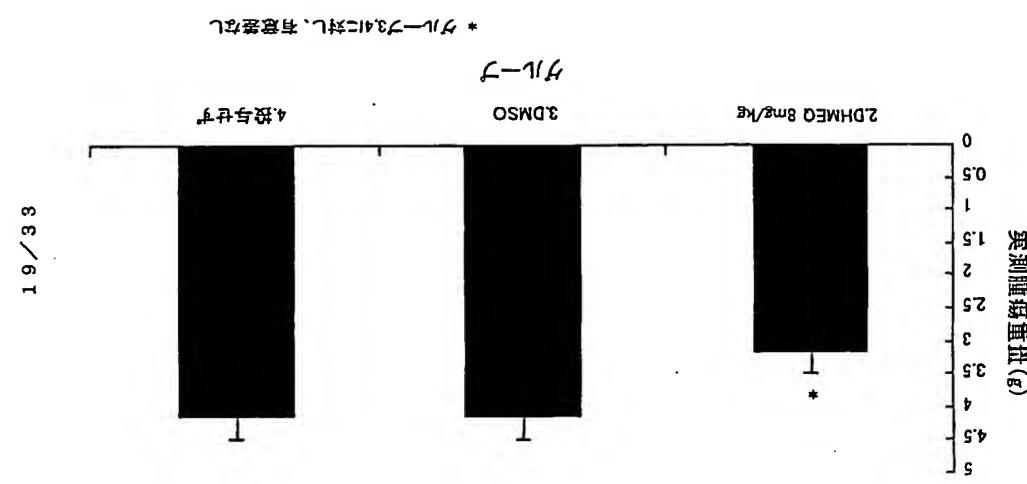


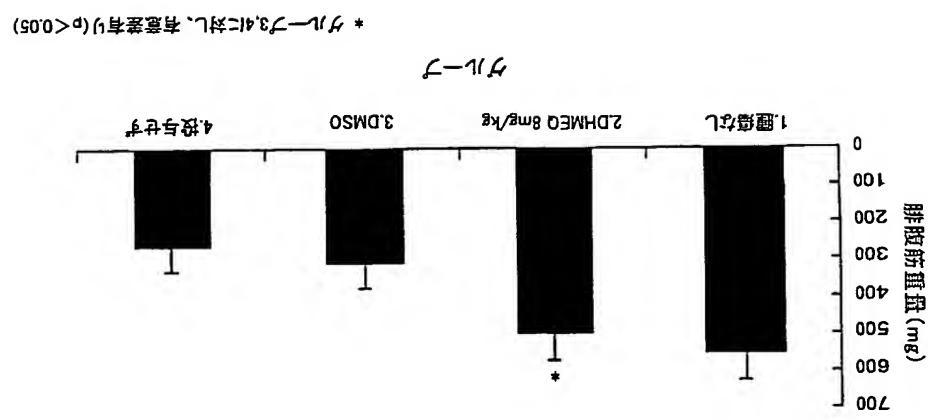
第 21 図

第 23 図



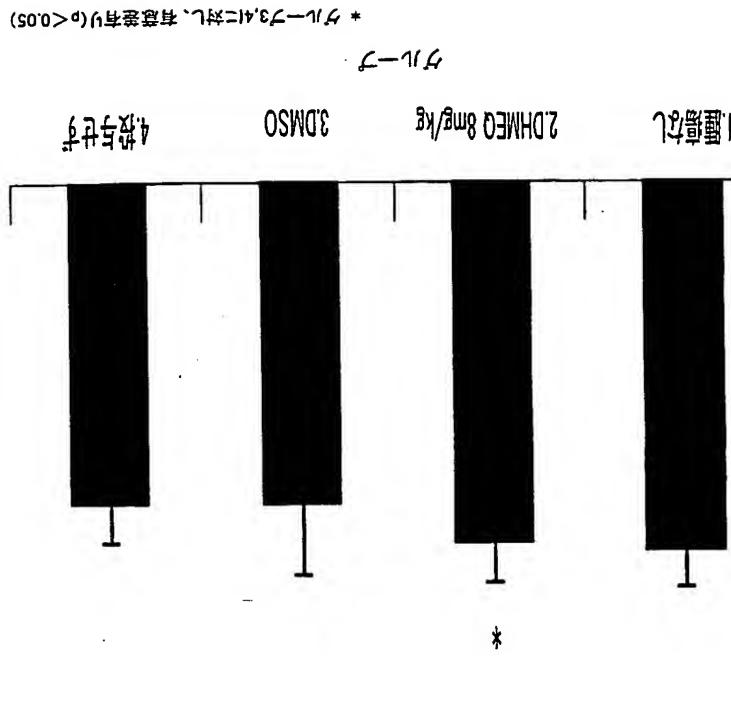
第 22 図





第 24 図

21/33

 $\text{MIL} \rightarrow$ 

第 25 図

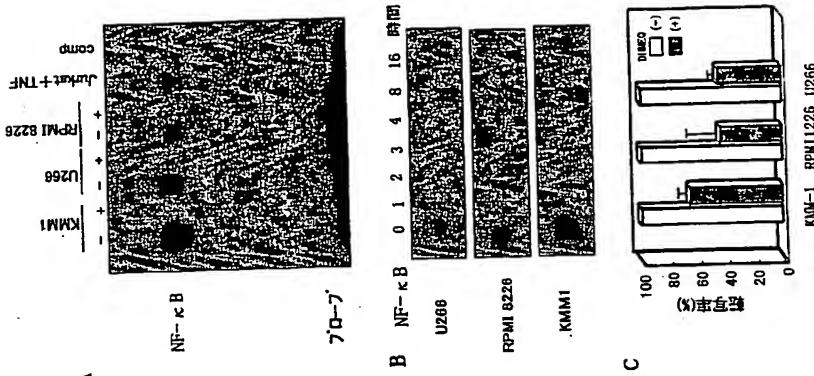
22/33

 $\text{MIL} \rightarrow$

၃၂

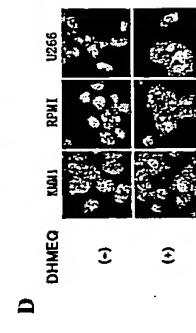
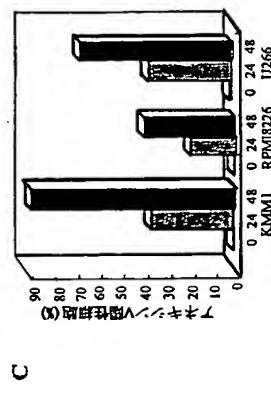
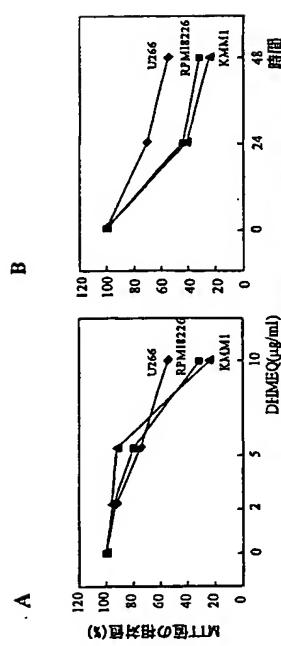
项目 (g/g)	重量 (+)	重量 (-)	重量 (+)	重量 (-)	重量 (+)	重量 (-)	重量 (+)	重量 (-)
纤维 (mg)	1689.9 ±44.1	+1709.5 ±81.3	1593.6 ±84.2	1262.3 ±86.2	0.9362	0.0222	纤维 (mg)	
蛋白质 (mg)	1092.2 ±64.4	+275.9 ±222	354.2 ±40.9	241.2 ±35.1	0.0691	0.7400	蛋白质 (mg)	
氨基酸 (mg)	562.9 ±16.6	+400.3 ±22.5	423.7 ±20.1	338.1 ±9.3	0.9818	0.0230	氨基酸 (mg)	
糖类 (mg)	2124.4 ±9.0	+2020.2 ±32	1530.2 ±9.7	1278.4 ±5.9	< 0.0001	0.0001	糖类 (mg)	
脂肪 (mg)	2046.5 ±7.7	+2046.6 ±13.8	1893.5 ±10.8	1568.8 ±2.9	0.3050	0.0056	脂肪 (mg)	
粗蛋白 (mg)	1633.3 ±45.5	+1417.7 ±43.3	1279.2 ±40.0	1144.4 ±23	0.0034	< 0.0001	粗蛋白 (mg)	
粗脂肪 (mg)	4324.0 ±6		412.6 ±1.1	0.3511	0.4027		粗脂肪 (mg)	

24 / 33

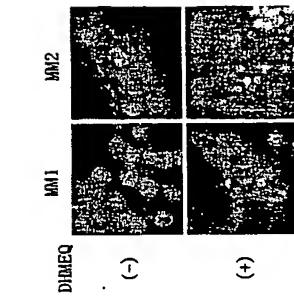
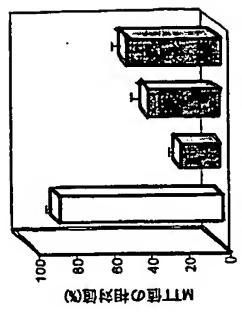


25/33

26/33



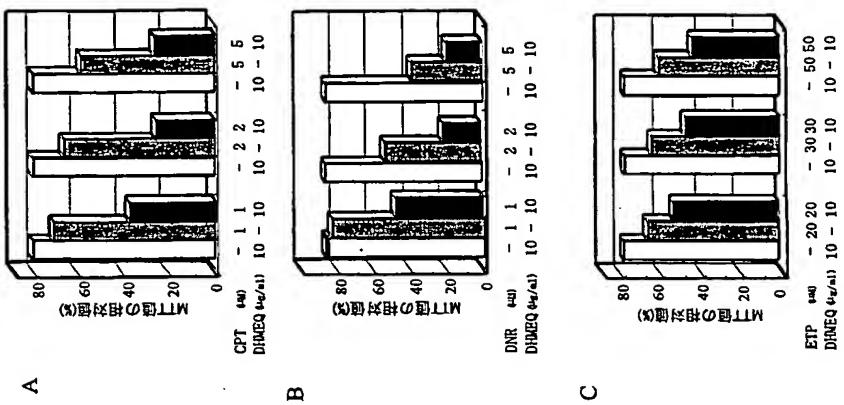
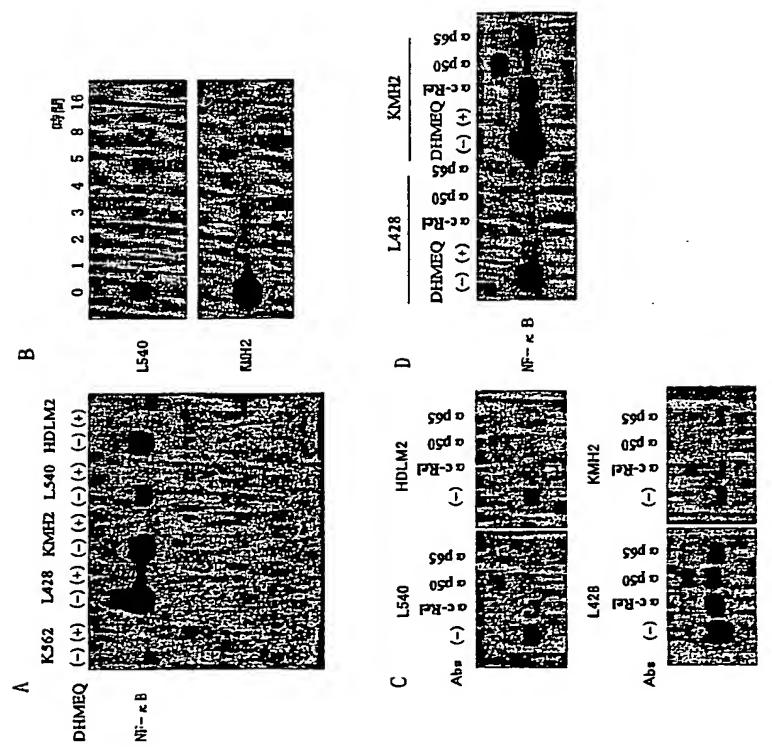
第 28 図

**A****B****B****A**

第 29 図

27/33

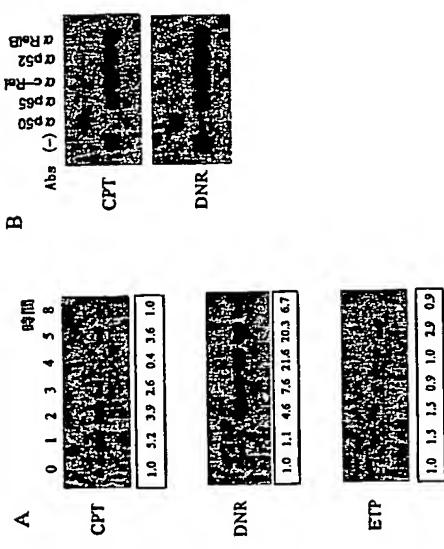
28/33



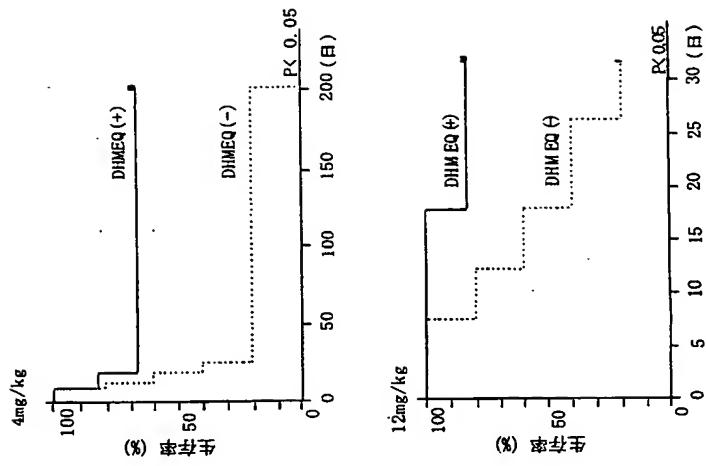
第 30 図

第 31 図

29/33

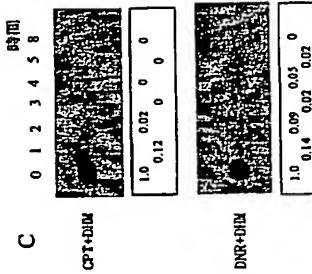


30/33

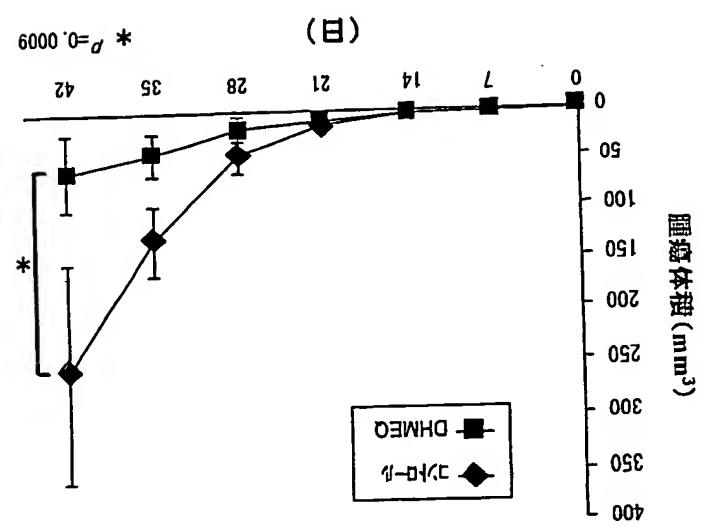


第33図

第32図

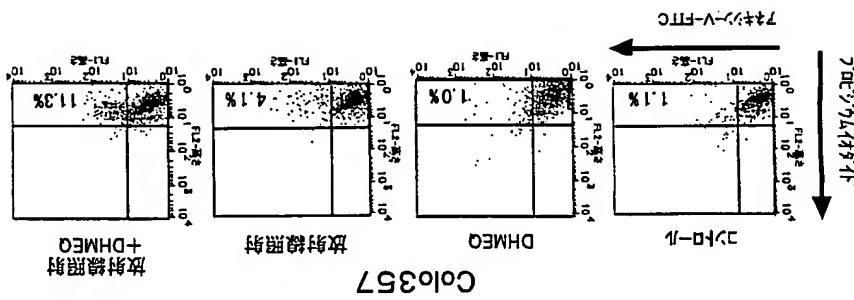


31/33



第 34 図

32/33



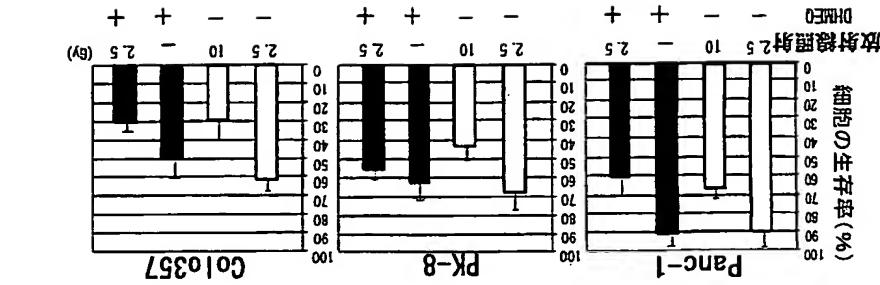
第 35 図

3 3 / 3 3

## SEQUENCE LISTING

WO 2004/002465

PCT/JP2003/008134



第 36 図

<110> KEIO UNIVERSITY  
 <120> Pharmaceutical composition comprising NF-κappaB inhibitor

&lt;130&gt; PCT/628

&lt;150&gt; JP 02/185866

&lt;151&gt; 2002-06-26

&lt;150&gt; JP 03/37167

&lt;151&gt; 2003-02-14

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Inventor: Umezawa Kazuo

Inventor: Kawai Yohko

Inventor: Horie Ryouichi

Inventor: Toshiiki Watanabe

Inventor: Toi Masakazu

Inventor: Matsumoto Gaku  
Inventor: Horiguchi Yutaka  
Inventor: Nakajima Jun

<223> synthetic DNA

<400> 3

atgttagggg actttcccg gc

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

agtttttttttgc acgtttcccg gg

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

tcaatccccc tggaaaatgtc cg

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/08134

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/08134

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  
 Int.Cl' A61K31/167, 45/00, 31/336, A61B9/10 101, 35/00, 35/04,  
 43/00

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (Classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61K31/167, 45/00, 31/336, A61B9/10 101, 35/00, 35/04,  
 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category'	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuo UMEZAWA, "Tensha Inshi NE- $\kappa$ B no Yakuwari to Seigaihai", SURGERY Frontier, 01 June, 2002 (01.06.02), Vol.9, No.2, pages 88 to 91	1-24, 27-34 25, 26
Y	WO 01/12588 A1 (MERCIAN CORP.), 22 February, 2001 (22.02.01), EP 1219596 A1 6 US 6566394 B1	1-34
Y	MURAMOTO, N., "Synthesis of NF- $\kappa$ B activation inhibitors derived from epoxyquinolinic C", Bioorg Med. Chem. Lett., (2000), vol.10, No.9, pages 865 to 869	1-34

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance;

"B" earlier document or publication on or after the international filing date which may have double or triple patenting effect;

"C" document which establishes the publication date of another document or which is relied upon to establish the publication date of another document;

"D" document which is cited for its special reasons (e.g. disclosure of new uses, combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art);

"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed;

"F" document published after the international filing date on behalf of the applicant but with the application not filed to establish the priority or to establish the invention cannot be considered as prior art or cannot be considered as involve an inventive step when the document is taken alone;

"G" document which is taken into account when determining whether the claimed invention involves an inventive step;

"H" document which is relied upon to establish the publication date of another document;

"I" document which is cited for its special reasons (e.g. disclosure of new uses, combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art);

"J" document member of the same patent family

Date of mailing of the [international] search report  
 19 August, 2003 (19.08.03)

Authorized officer  
 Telephone No.  
 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office  
 Facsimile No.

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category'	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
Y	ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4", J. Biol. Chem., 26 April, 2002 (26.04.02), Vol.277, No.17, Pages 15028 to 15034
Y	YAN Z., "Benzofulpyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF- $\kappa$ pAb", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 18 February, 2000 (18.02.00), Vol.275, No.7, Pages 4949 to 4955
Y	Keiichi NISHIKAWA, "NF- $\kappa$ pAb as a therapeutic drug target.", Folia Pharmacologica Japonica, (2001), Vol.118, No.3, pages 197 to 202
P,X	WO 02/019632 A1 (Institute of Medicinal Molecular Design Inc.), 27 June, 2002 (27.06.02), 6 AU 2002022683 A

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JPO3/08134

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)  
This International Search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reason:

1.  Claims Nos.: 35-46 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 35-46 pertain to methods for treatment of a human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Article 17(2) (a)(1) and Rule 39.1.(iv).
2.  Claims Nos.: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 34 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(d).

**Box II** Observations where duty of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

Claims 1-24 and 27-34 relate to a drug composition for cancer treatment comprising a compound having NF- $\kappa$ B inhibiting activity as an active ingredient, while claims 25 and 26 relate to a drug composition for arteriosclerosis treatment comprising a compound having NF- $\kappa$ B inhibiting activity as an active ingredient.

The matter common to claims 1-34 is a drug composition comprising a compound having NF- $\kappa$ B inhibiting activity as an active ingredient. However, this is disclosed in references (see WO 01/12388 A1, WO 99/65449 A1, etc.) and is thus not novel. Consequently, the drug composition comprising a compound (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were duly paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention(s) mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JPO3/08134

## Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

having NF- $\kappa$ B inhibiting activity as an active ingredient does not emerge from the state of prior art, and this common matter cannot be recognized as special technical features.

Further, there exists no other matter which is common to all the claims and can be considered as special technical features. Therefore, the number of inventions of this application is 2.

## Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

<Subject of search>  
Claims 19,21,23,25,27,29,34 relate to a drug composition for arteriosclerosis or tumor treatment comprising a compound defined by desired property "having NF- $\kappa$ B inhibiting activity" as an active ingredient. The compounds of claims 19,21,23,25,27,29,34 comprehend all the compounds having such property. However, only slight proportion of the claimed compounds are disclosed within the meaning of PCT Article 5, and hence it appears that the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacked.

Moreover, with respect to the "compounds having NF- $\kappa$ B inhibiting activity", the scope of compounds having such property cannot be determined even if the technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account. Consequently, the claims 19,21,23,25,27,29,34 also fail to satisfy the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, the International search has been performed on the drug composition for arteriosclerosis or tumor treatment comprising any of those compounds which have been concretely described in the description with respect to the relationship between "compound having NF- $\kappa$ B inhibiting activity" and arteriosclerosis or tumor and which are identified in claim 1, etc. as an active ingredient.

国際特許番号	国際出願番号	国際出願番号 PCT/JPO 3/08134
A. 異邦の属する分野(国際特許分類(I.P.C.))	C. (続き) . 国連すると認められる文獻	関連する請求の番号
B. 国連を行った分野 「既にを行った最も優れた」(国際特許分類(I.P.C.))	引用文獻の カテゴリー*	引用文獻名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
Int. C 1' A61K 31/167, 46/00, 31/336, A61P 9/10 101, 36/00, 36/04, 43/00	Y	ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular ISCP0. Role of Toll-like Receptor (TLR 2 and TLR4)." J. Biol. Chem. (2002.04.26), Vol.277, No.17, pp.15028-15034 1-34
Int. C 1' A61K 31/167, 46/00, 31/336, A61P 9/10 101, 36/00, 36/04, 43/00	Y	YAN Z., "Benzol[sp]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (2000. 02.18) Vol. 275, No. 7, pp. 4949-4955 1-34
最少量以外の資料で図表を行った分野に含まれるもの	Y	鶴川豊一, "NF-kappa B as a therapeutic drug target." 日本薬理学会雑誌, (2001), Vol. 118, No. 3, pp. 197-202 1-34
国際出で使った電子データベースの名前、図表に使った用語 CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)	PX	WO 02/049632 A1 (株式会社医薬分子設計研究所) 2002. 06. 27 & AU 20020226 83 A 1-34
C. 国連すると認められる文獻	引用文獻の カテゴリー*	関連する請求の番号
	X	船津一夫, "能孚因子NF-κBの抑制と阻害剤" Surgery Frontier (2002. 06. 01) VOL. 9, NO. 2, pp. 88-91 1-24, 27-34
	Y	NO 01/12588 A1 (HEKCIAN CORPORATION) 2001. 02. 22 & EP 1219596 A1 & AU 2000064727 A & US 6566394 B1 25, 26 1-34
	Y	MATSUMOTO, N., "Synthesis of NF-κB activation inhibitors derived from epoxyquinolinic C" Biorg Med Chem Lett., (2000), Vol. 10, No. 9, pp. 865-869 1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Cの図にも文獻が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パンントファミリーに関する別紙を参照。		

国際特許番号	国際出願番号	国際出願番号 PCT/I SA/210 (第2ページ) (1998年7月)
A. 異邦の属する分野(国際特許分類(I.P.C.))	C. (続き) . 国連すると認められる文獻	関連する請求の番号
Int. C 1' A61K 31/167, 46/00, 31/336, A61P 9/10 101, 36/00, 36/04, 43/00	Y	ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular ISCP0. Role of Toll-like Receptor (TLR 2 and TLR4)." J. Biol. Chem. (2002.04.26), Vol.277, No.17, pp.15028-15034 1-34
Int. C 1' A61K 31/167, 46/00, 31/336, A61P 9/10 101, 36/00, 36/04, 43/00	Y	YAN Z., "Benzol[sp]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (2000. 02.18) Vol. 275, No. 7, pp. 4949-4955 1-34
最少量以外の資料で図表を行った分野に含まれるもの	Y	鶴川豊一, "NF-kappa B as a therapeutic drug target." 日本薬理学会雑誌, (2001), Vol. 118, No. 3, pp. 197-202 1-34
国際出で使った電子データベースの名前、図表に使った用語 CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)	PX	WO 02/049632 A1 (株式会社医薬分子設計研究所) 2002. 06. 27 & AU 20020226 83 A 1-34
C. 国連すると認められる文獻	引用文獻の カテゴリー*	関連する請求の番号
	X	船津一夫, "能孚因子NF-κBの抑制と阻害剤" Surgery Frontier (2002. 06. 01) VOL. 9, NO. 2, pp. 88-91 1-24, 27-34
	Y	NO 01/12588 A1 (HEKCIAN CORPORATION) 2001. 02. 22 & EP 1219596 A1 & AU 2000064727 A & US 6566394 B1 25, 26 1-34
	Y	MATSUMOTO, N., "Synthesis of NF-κB activation inhibitors derived from epoxyquinolinic C" Biorg Med Chem Lett., (2000), Vol. 10, No. 9, pp. 865-869 1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Cの図にも文獻が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パンントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文獻のカテゴリー 「A」 特殊のある文獻ではなく、一般的技術水準を示す 「B」 国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表される文獻であって、特許の原典又は理論的根柢となる文獻である。 「C」 特に記述を要する文獻であって、当該文獻のつまで説明の新規性及び独創性がないと、やきらかれるもの 「D」 特に記述を要する文獻であって、当該文獻の上に開拓のある文獻であって、当該文獻と他の1以上の文獻との、理由を付す 「E」 国際出願日以前で、かつて公表された文獻 「F」 国際出願日以前で、かつて公表された文獻と同様の文獻		* 国際出願文は、原則として先 日本国内特許 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番9号
国際出願を完了した日	0 4 0 8 0 3	国際出願特許の発送日 19.08.03
国際出願の名前及び先 日本国内特許 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番9号		特許庁審査官 (特許のあらわし) 1 P 9 8 3 7 電話番号 03-3681-1101 内線 3492

新1型 様々の細胞の一部の細胞ができないときの意見。(第1-ページの2の続き)

新2型 第3項 (PCT 17条(2)(c)) の規定により、この国際特許登録が日本に係るものでない。

1.  様々の範囲\_3.5-4.6\_\_\_\_\_は、この国際特許登録が日本に係るものである。

つまり、請求による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2) (1) 及びPCT規則3.9.1 (IV) の規定により、この国際特許登録が日本に係ることを要しない対象に係るものである。

2.  様々の範囲\_19.21.23.25.27.29.34\_\_\_\_\_は、本件が日本に係るものである。つまり、請求による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2) (1) 及びPCT規則3.9.1 (IV) の規定により、この国際特許登録が日本に係るることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

特別-ページ参照。

3.  様々の範囲\_\_\_\_\_は、左欄請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

注記欄 様々の出-生-性が次に述べているときの意見 (第1-ページの3の続き)

次に述べるように、この国際特許登録は認めた。

請求の範囲\_24及び27-34\_\_\_\_\_は、N F- $\times$  B阻害作用を有する化合物を有効成分とする疾の治療のための医薬組成物を題するものであり、請求の範囲25及び26は、N F- $\times$  B阻害作用を有する化合物を有効成分とする乳頭腫化治療のための医薬組成物を題するものである。

請求の範囲\_24に共通の事項は、N F- $\times$  B阻害作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物であるが、これは文献上に開示された(IK 01/1258 AI, WO 98/53449 AI等参照)、新規ではないから、N F- $\times$  B阻害作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物は先行技術の域を出す、この共通事項は特別な技術的特徴でなくとも認められない。

また、請求の範囲全てに共通事項であって、特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、本出願に含まれる共同の数は2である。

1.  出願人が必要な追加請求手数料をすべて期間内に納付したので、この国際特許登録は、すべての請求可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加請求手数料を請求するまもなく、すべての請求可能な請求の範囲について陳述することができたので、追加請求手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加請求手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際特許登録は、手数料の納付のあつた次の請求の範囲のみについて作成した。

追加請求手数料の算出についてに附する注意

- 追加請求手数料の納付と共に出願人から眞理申立てがあつた。
- 追加請求手数料の納付と共に出願人から眞理申立てがなかつた。

様式 PCT/I SA/210 (第1-ページの接着 (1)) (1998年7月)

<請求のおにについて>

請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34は、「N F- $\times$  B阻害作用を有する」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする動脈硬化または腫瘍の治療のための医薬組成物に関するものである。そして、請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34に係る化合物は、そのような性質を有するあらゆる化合物を含むべきである。そのものであるが、PCT第6条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による當付けを次くものと認められる。

また、「N F- $\times$  B阻害作用を有する化合物」は、出願時の技術常識としてもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34は、PCT第6条における動脈硬化または腫瘍の治療のための医薬組成物について行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**